



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA-FÍSICA APLICADA



TESIS DOCTORAL

**IDENTIFICACIÓN DE SNPs IMPLICADOS EN LA DIFERENTE
RESPUESTA A COMPONENTES DE LA DIETA Y ASOCIACIÓN CON
ENFERMEDADES RELACIONADAS CON LA ALIMENTACIÓN:
ESTUDIOS NUTRIGENÉTICOS**



**Instituto Madrileño de Estudios Avanzados en Alimentación
(IMDEA Alimentación)**

MARÍA ISABEL ESPINOSA SALINAS

MADRID, 2017



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA-FÍSICA APLICADA



**IDENTIFICACIÓN DE SNPs IMPLICADOS EN LA DIFERENTE
RESPUESTA A COMPONENTES DE LA DIETA Y ASOCIACIÓN CON
ENFERMEDADES RELACIONADAS CON LA ALIMENTACIÓN:
ESTUDIOS NUTRIGENÉTICOS**



**Instituto Madrileño de Estudios Avanzados en Alimentación
(IMDEA Alimentación)**

Memoria presentada por

María Isabel Espinosa Salinas

Para optar al grado de

DOCTOR EN BIOLOGÍA Y CIENCIAS DE LA ALIMENTACIÓN

Directora: Dra. Ana Ramírez de Molina

Directora: Dra. Viviana Loria Kohen

Tutor: Prof. Dr. Guillermo Reglero Rada

D^a. ANA RAMÍREZ DE MOLINA, DRA. EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR POR LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID Y D^a VIVIANA LORIA KOHEN, DRA. EN MEDICINA POR LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID, ACTUALMENTE INVESTIGADORAS DE IMDEA ALIMENTACIÓN

INFORMAN:

Que el presente trabajo titulado "Identificación de SNPs implicados en la diferente respuesta a componentes de la dieta y asociación con enfermedades relacionadas con la alimentación: estudios nutrigenéticos " que constituye la memoria que presenta D^a. María Isabel Espinosa Salinas para optar al grado de Doctor en Biología y Ciencias de la Alimentación, ha sido realizado en el Instituto Madrileño de Estudios Avanzados en Alimentación (IMDEA Alimentación) bajo su dirección, y consideran que el estudio experimental es original y los resultados tienen suficiente calidad científica para su presentación como Tesis Doctoral en el Departamento de Química-Física Aplicada de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que así conste, firman el presente informe:

Dra. Ana Ramírez de Molina

Dra. Viviana Loria Kohen

“Lo que sabemos es una gota de agua; lo que ignoramos es el océano”

— Isaac Newton

AGRADECIMIENTOS

Un pájaro posado en un árbol nunca tiene miedo de que la rama se rompa, porque su confianza no está en la rama sino en sus propias alas. Gracias a todos los que me habeís animado y contribuido a mi crecimiento y confianza en mi misma. Y en especial quiero agradecer...

A mis dos Directoras de Tesis. A la Dra. Ana Ramírez de Molina, agradecerte tu gran confianza hacia mí desde el primer momento, tu apoyo y ánimo. Por ayudarme a crecer tanto en lo profesional como en lo personal. A la Dra. Viviana Loria Kohen, agradecerte tu paciencia y ayuda. Por llevarme de la mano y enseñarme los gajes del oficio, los gajes de la vida.

A mi Tutor el Prof. Guillermo Reglero, Director de IMDEA Alimentación, agradecerte en primer lugar que me hayas dado la oportunidad (junto con la Prof. Manuela Juárez, antigua Directora del Instituto), de trabajar en IMDEA Alimentación. Por ser mi profesor y mi padre a nivel profesional. A Inmaculada Galindo, por el enorme esfuerzo dedicado a la gestión del Instituto. Sin vuestra apuesta y dedicación, nada de esto hubiera sido posible.

A todos los profesionales que han contribuido o que contribuyen día a día, en el desarrollo de IMDEA Alimentación. Agradeceros el gran compañerismo y buen ambiente, lo cual es algo muy valioso y difícil de encontrar. Agradecerte, Su, por ser mi hermana mayor a nivel profesional. Nacimos juntas, seguimos juntas. Por tu apoyo moral incondicional cada vez que te he necesitado, tu comprensión y confianza. A Helena (mi “Nuski”), mi hermana pequeña, compañera de ánimos, por tu gran entusiasmo y ganas de aprender. A Rocío y Elena por vuestra gran disponibilidad para ayudar y trabajar, así como por vuestro sentido del humor. Agradecerte Jesús, el aguantarme una y otra vez con los múltiples análisis estadísticos, vueltas dadas y por ese maravilloso 2012-2013-2014-2015...

A Francesco Visioli, compañero de camino, agracerte tu gran ayuda y constante presencia silenciosa. Por tu perfecto equilibrio entre tu gran sentido del humor, bondad, sabiduría, profesionalidad y humanidad. Siempre serás un crack para mí. A Arancha Rodríguez, a Alberto Dávalos, Jose María Ordovás, Pablo Fernández y Moisés Laparra, por vuestro conocimiento y amabilidad.

A Ruth, Teo, Lidia, Namaa, Nathalie, Elena, Val, Patricia Casas, Joao, Emma, Marta's, Josune, María, Cristina, Lara, Clara, Marga, Roberto, Victor, Belén, Mónica, Carmen, Judit, Lamia, Silvia's, Jorge, Luís Filipe, Elena y Laura, por vuestra paciencia, compañerismo y amistad.

A Gema, Carlos, Patrícia, Pilar, Cristina, Sara, Marta, Astrid, Alex y Diego por contribuir a que mi Tesis haya salido adelante, por animarme y apoyarme. A Manu (Răzvan, Carlitos Wey, Juanma) por poner la chispa simpática, a Rubén y a Julia por cuidarme, a María Angeles, Luísmi, Luis, Sara, por sus visitas para ver si seguía viva.

A Biosearch S.A., a Corporación Alimentaria Peñasanta Sociedad Anónima y todos los voluntarios que han formado parte de los proyectos. A Integra-e por desarrollar la aplicación necesaria para el trabajo y responder tan bien. Al grupo de Reducol e IdiPAZ por iniciarme con ellos.

A mis amigos. A Ale, por ayudarme a salir de mi realidad de vez en cuando, por estar siempre que lo necesito. A David por animarme, aportarme experiencia y consejo, por valorarme. A Curro, que me ha mostrado que los límites de la vida están aún más lejos de lo que yo incluso supongo. A Ire, Ali, Alejandra, Moni, Fadi, Quique, por seguir siendo mis amigos pese a mantenerlos a veces en el olvido. A Javi y a José por haber estado siempre ahí y quererme. A Alfonso, por su sentido del humor, conceptos filosóficos y hacerme valiosa. Cristina, por permitirme ver en tu reflejo mis partes más vulnerables.

Al grupo de masaje por vuestra grandeza, al de baile por vuestro acogimiento, al de circo por enseñarme una de las cosas más importante de mi vida: enseñarme a VOLAR..., enfrentarme cara a cara con mis miedos. Al grupo de hablar en público por compartir experiencias. Al grupo de vóley y de pádel por permitirme conocerlos y desestresarme con vosotros. Al grupo de mind, por brindarme la oportunidad de crecer interiormente, en especial a Yolanda, por ayudarme a vivir plenamente.

A toda mi familia, en especial a mi padre y a mi madre por preocuparos por mí, por intentar entender y preguntarme cuanto quedaba ya. A mi hermano, porque te quiero como nunca sabrás, por intentar arreglarme el usb de la Tesis. A todos mis abuelos porque sin ellos yo ahora no estaría aquí, y mis tíos y primos por vuestras bromas e interés hacia mí. A Osi, Boni, Fifo, etc. por aportarme la textura blandita, tan necesaria en momentos duros, en los que la paciencia y la dulzura terminan de conseguirlo todo.

A mí, por mi incansable perseverancia, capacidad de superación, fuerza de voluntad, valor e incalculables ganas de seguir aprendiendo, seguir creciendo. A esta Tesis, por aumentar mis conocimientos y mejorar la forma de proceder, por ayudarme a cultivar la paciencia, y ayudarme a cercar en el ámbito más importante, la Vida.

Más que intentar volverse una persona de éxito, mejor ser una persona de valor.

- Albert Einstein.

31 de enero de 2016

**IDENTIFICACIÓN DE SNPs IMPLICADOS EN LA DIFERENTE
RESPUESTA A COMPONENTES DE LA DIETA Y ASOCIACIÓN CON
ENFERMEDADES RELACIONADAS CON LA ALIMENTACIÓN:
ESTUDIOS NUTRIGENÉTICOS**

RESUMEN

RESUMEN

Actualmente, las enfermedades crónicas constituyen un problema a nivel mundial que produce cada vez más causas de discapacidad y muerte prematura, además de afectar a la calidad de vida de la población. Dichas patologías, entre las que se encuentran la enfermedad cardiovascular, la obesidad, la diabetes o el cáncer, son enfermedades poligénicas, en las cuales múltiples genes influyen en la susceptibilidad a padecerlas, bajo la influencia a su vez, de múltiples factores ambientales. Comparten así, factores de riesgo comunes y modificables, entre los que destacan una alimentación inadecuada y niveles reducidos de actividad física. El estudio de variaciones puntuales de un único nucleótido en el genoma (SNPs), implicados en la susceptibilidad genética a padecer estas enfermedades y su interacción con la dieta (nutrigenética), constituye la base científica de la denominada nutrición personalizada.

En el presente trabajo se analiza en humanos, la asociación de polimorfismos de un solo nucleótido en genes implicados en el desarrollo de obesidad, enfermedades cardiovasculares, inflamación y alteraciones metabólicas, con las características fenotípicas y la diferente respuesta a los efectos saludables de componentes de la dieta.

Para ello, se ha llevado a cabo la implantación y desarrollo de la Plataforma “Cantoblanco” de Genómica Nutricional y Alimentación (GENYAL), infraestructura que integra distintas cohortes de voluntarios con sistemas bioinformáticos de gestión de datos y plataformas tecnológicas de análisis genómico, análisis bioquímico y análisis estadístico. La población de esta plataforma ha sido caracterizada genotípica y fenotípicamente, y se han realizado estudios de asociación fenotipo-genotipo, y de interacción gen-dieta, con el fin de determinar la influencia de polimorfismos de un solo nucleótido sobre el estado de salud y la variabilidad de respuesta al consumo de productos de uso específico para la salud.

Los resultados han mostrado que la población estudiada, mayoritariamente joven y sana, presenta sin embargo niveles de colesterol plasmático, peso y composición corporal elevados. Con respecto a sus hábitos dietéticos, se ha observado una ingesta elevada de grasas y azúcares simples, a la vez que una ingesta reducida en vitamina D, valores que se asemejan al consumo de la población española. Dichos resultados, unidos a los antecedentes familiares relativos a enfermedades crónicas no despreciables, hacen destacar la importancia de la prevención de enfermedades asociadas a dichos factores de riesgo.

Con respecto al estudio de asociación genotipo-fenotipo, se han identificado diferentes variantes genéticas pertenecientes a genes relacionados con el metabolismo, implicadas en el fenotipo y estilo de vida de la población. De forma destacable, se ha observado que el alelo minoritario de la variante rs3749474 CLOCK, indica una posición desfavorable debido a que presenta un aumento cinco veces mayor del índice cintura-cadera conforme aumenta un grado el apetito, en comparación con los portadores del genotipo homocigoto común. Por ello, dichos portadores, se pueden ver beneficiados mediante pautas personalizadas para aumentar la saciedad y horas de sueño.

Con respecto a la influencia de polimorfismos de un solo nucleótido en la variabilidad a la respuesta a productos alimentarios de uso específico para la salud, se ha observado que en lo que respecta al consumo diario de leche enriquecida con ácidos grasos poliinsaturados omega-3, ácido oleico y vitaminas, los portadores del genotipo homocigoto común del rs135551 PPAR α y rs2205895 SELP, presentan mayores probabilidades de beneficiarse más del consumo de leche enriquecida en la prevención de las enfermedades cardiovasculares, en comparación con la ingesta de leche semidesnatada. A su vez, se ha observado que el polimorfismo rs135549 PPAR α modula la magnitud de los efectos del consumo de leche semidesnatada y desnatada sobre una serie de biomarcadores de riesgo cardiovascular, de manera que el genotipo común de esta variante, se asocia con una reducción del cociente TC/HDL y LDL/HDL después de consumir leche desnatada, así como un aumento después del consumo de leche semidesnatada.

En el caso del estudio del consumo de una bebida láctea funcional con inhibidores de α -amilasa en sujetos con sobrepeso y obesidad, a pesar de que su empleo dentro del contexto de una dieta hipocalórica equilibrada posee un efecto beneficioso al contribuir a una mejora en el perfil glucémico y lipídico, la falta de un efecto biológico significativo limita la identificación de variantes genéticas implicadas en la respuesta al producto.

Si bien aún es necesario seguir avanzando en el estudio de los efectos moleculares de los componentes de la dieta y su interacción con el genoma, este estudio revela que hay individuos con determinados genotipos que se pueden beneficiar especialmente de recomendaciones dietéticas específicas para prevenir o contribuir al tratamiento de enfermedades crónicas, las cuales pueden no corresponder con las recomendaciones actualmente consensuadas. La nutrición personalizada supone, por tanto, una potente y prometedora herramienta para definir unas recomendaciones nutricionales de precisión

adaptadas a las características de cada individuo, eficaces en la prevención y tratamiento de enfermedades relacionadas con la alimentación.

ÍNDICE

ÍNDICE

RESUMEN	15
LISTA DE TABLAS.....	25
LISTA DE FIGURAS.....	27
ABREVIATURAS.....	29
1 INTRODUCCIÓN	33
1.1 ENFERMEDADES RELACIONADAS CON LA NUTRICIÓN	33
1.1.1 OBESIDAD	33
1.1.2 ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES	40
1.2 PROCESOS METABÓLICOS ASOCIADOS CON ENFERMEDADES RELACIONADAS CON LA NUTRICIÓN	47
1.2.1 ENFERMEDAD CRÓNICA Y PROCESO INFLAMATORIO	47
1.2.2 METABOLISMO LIPÍDICO	51
1.3 COMPUESTOS CON EFECTO RELEVANTE EN EL DESARROLLO DE ENFERMEDADES RELACIONADAS CON LA NUTRICIÓN	54
1.3.1 ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3	55
1.3.2 INHIBIDORES DE LA ALFA AMILASA	62
1.3.3 FIBRA Y FRUCTOOLIGOSÁCARIDOS	66
1.3.4 ESTEROLES VEGETALES.....	70
1.4 INFLUENCIA DEL GENOMA HUMANO SOBRE LA SALUD Y LA RESPUESTA A COMPONENTES DE LA DIETA	73
1.4.1 EL GENOMA HUMANO	73
1.4.2 NUTRIGENÉTICA	80
1.4.3 INTERÉS BIOSANITARIO	80
2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	87
2.1 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	87
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	88
3 MATERIAL Y MÉTODOS.....	91
3.1 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE LA POBLACIÓN DE LA PLATAFORMA CANTOBLANCO PARA ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN Y ENSAYOS CLÍNICOS DE INTERVENCIÓN.....	91
3.1.1 RECLUTAMIENTO DE PARTICIPANTES Y CONSIDERACIONES ÉTICAS	91
3.1.2 ALMACENAMIENTO DE DATOS Y MUESTRAS	93
3.1.3 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA.....	95

3.1.4	CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA	105
3.1.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	125
3.2	ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN FENOTIPO Y GENOTIPO DE LA POBLACIÓN DE LA PLATAFORMA CANTOBLANCO	127
3.2.1	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	128
3.3	ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES GEN-DIETA ENTRE MARCADORES GENÉTICOS Y DETERMINADOS COMPONENTES DE LOS ALIMENTOS MEDIANTE ENSAYOS NURIGENETICOS DE INTERVENCIÓN.....	131
3.3.1	“IDENTIFICACIÓN DE SNPS IMPLICADOS EN LA DIFERENTE RESPUESTA A UNA LECHE ENRIQUECIDA CON ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3, ÁCIDO OLEICO Y VITAMINAS”	131
3.3.2	“ESTUDIO DE INTERVENCIÓN NUTRICIONAL SOBRE LA EFICACIA DE LA INGESTA DIARIA DE UNA BEBIDA LÁCTEA EN VOLUNTARIOS SANOS CON SOBREPESO Y OBESIDAD”	137
4	RESULTADOS.....	153
4.1	CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE LA POBLACIÓN DE LA PLATAFORMA CANTOBLANCO PARA ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN Y ENSAYOS CLÍNICOS DE INTERVENCIÓN.....	153
4.1.1	RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA	153
4.1.2	RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA.....	166
4.2	ESTUDIO DE ASOCIACIÓN FENOTIPO-GENOTIPO EN LA POBLACIÓN DE LA PLATAFORMA CANTOBLANCO	170
4.2.1	ASOCIACIÓN DE LAS VARIANTES GENÉTICAS ESTUDIADAS CON LOS ESTILOS DE VIDA.....	170
4.2.2	ASOCIACIÓN DE LAS VARIANTES GENÉTICAS ESTUDIADAS CON LAS MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS Y DE CONSTANTES VITALES	171
4.2.3	ASOCIACIÓN DE VARIANTES GENÉTICAS ESTUDIADAS CON LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS.....	172
4.2.4	INTERACCIÓN DE LAS VARIANTES GENÉTICAS ESTUDIADAS CON NUTRIENTES Y ALIMENTOS CONSUMIDOS.....	176
4.3	ANÁLISIS DE LAS INTERACCIONES GEN-DIETA ENTRE MARCADORES GENÉTICOS Y DETERMINADOS COMPONENTES DE LOS ALIMENTOS MEDIANTE ENSAYOS NURIGENETICOS DE INTERVENCIÓN.....	178
4.3.1	“IDENTIFICACIÓN DE SNPs IMPLICADOS EN LA DIFERENTE RESPUESTA A UNA LECHE ENRIQUECIDA CON ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3, Y EL PERFIL LIPIDICO DE LA LECHE”	178
4.3.2	“ESTUDIO DE INTERVENCIÓN NUTRICIONAL SOBRE LA EFICACIA DE LA INGESTA DIARIA DE UNA BEBIDA LÁCTEA EN VOLUNTARIOS SANOS CON SOBREPESO Y OBESIDAD”	190
5	DISCUSIÓN	213

5.1	DISCUSIÓN DE LA CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE LA POBLACIÓN DE LA PLATAFORMA CANTOBLANCO PARA ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN Y ENSAYOS CLÍNICOS DE INTERVENCIÓN	213
5.1.1	DISCUSIÓN DE LA CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA.....	213
5.1.2	DISCUSIÓN DE LA CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA.....	225
5.2	DISCUSIÓN DE LA ASOCIACIÓN FENOTIPO-GENOTIPO EN LA POBLACIÓN DE LA PLATAFORMA CANTOBLANCO	226
5.2.1	DISCUSIÓN DE LA ASOCIACIÓN DE LAS VARIANTES GENÉTICAS ESTUDIADAS CON LOS ESTILOS DE VIDA.....	226
5.2.2	DISCUSIÓN DE LA ASOCIACIÓN DE LAS VARIANTES GENÉTICAS ESTUDIADAS CON LAS MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS.....	228
5.2.3	DISCUSIÓN DE LA ASOCIACIÓN DE LAS VARIANTES GENÉTICAS ESTUDIADAS CON LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS	229
5.2.4	DISCUSIÓN DE LA INTERACCIÓN DE LAS VARIANTES GENÉTICAS ESTUDIADAS CON NUTRIENTES Y ALIMENTOS CONSUMIDOS	234
5.3	DISCUSIÓN DE LAS INTERACCIONES GEN-DIETA ENTRE MARCADORES GENÉTICOS Y DETERMINADOS COMPONENTES DE LOS ALIMENTOS MEDIANTE ENSAYOS NUTRIGENÉTICOS DE INTERVENCIÓN.....	237
5.3.1	“IDENTIFICACIÓN DE SNPs IMPLICADOS EN LA DIFERENTE RESPUESTA A UNA LECHE ENRIQUECIDA CON ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3, Y EL PERFIL LIPIDICO DE LA LECHE”	237
5.3.2	“ESTUDIO DE INTERVENCIÓN NUTRICIONAL SOBRE LA EFICACIA DE LA INGESTA DIARIA DE UNA BEBIDA LÁCTEA EN VOLUNTARIOS SANOS CON SOBREPESO Y OBESIDAD”	247
6	CONCLUSIONES	259
7	BIBLIOGRAFÍA	263
8	ANEXOS.....	303
	ANEXO 1. HOJA DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL ESTUDIO SOBRE CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE LA POBLACIÓN.....	303
	ANEXO 2. REGISTRO DEL CONSUMO DE ALIMENTOS Y BEBIDAS DE 72 HORAS.....	308
	ANEXO 3. REGISTRO DE LA FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS.....	312
	ANEXO 4. CUESTIONARIO DE ACTIVIDAD FÍSICA EN EL TIEMPO LIBRE DE MINNEOSTA	318
	ANEXO 5. COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DE LOS DIFERENTES TIPOS DE LECHE CONSUMIDAS.....	320
	ANEXO 6. HOJA DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL ESTUDIO DE INTERVENCIÓN NUTRICIONAL SOBRE LA EFICACIA DE LA INGESTA DIARIA DE UNA BEBIDA LÁCTEA EN VOLUNTARIOS SANOS CON SOBREPESO Y OBESIDAD	321
	ANEXO 7. EJEMPLO DE PLAN DE ALIMENTACIÓN HIPOCALÓRICO INDIVIDUALIZADO.....	329
	ANEXO 8. COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DE LAS BEBIDAS ESTUDIO.....	333

ANEXO 9. ESQUEMA ACTIVIDADES DEL ESTUDIO DE INTERVENCIÓN NUTRICONAL SOBRE LA EFICACIA DE LA INGESTA DIARÍA DE UNA BEBIDA LACTEA EN VOLUNTARIOS SANOS CON SOBREPESO Y OBESIDAD.....	335
ANEXO 10. ESCALA ANALOGICA VISUAL	336
9 ARTÍCULOS Y COMUNIDACIONES CIENTÍFICAS	339
9.1 Artículos científicos	339
9.2 Comunicaciones científicas	339

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1 - Alteraciones asociadas al sobrepeso y obesidad.	37
Tabla 1.2- Contenido de lipoproteínas en las diferentes apolipoproteínas.....	52
Tabla 1.3- Compuestos producidos en las rutas metabólicas de la ciclooxigenasas y lipooxigenasas	55
Tabla 1.4- Contenido de ácidos grasos omega-3, en diferentes alimentos	57
Tabla 1.5 - Contenido de ácidos grasos poliinsaturados de diferentes aceites culinarios.....	58
Tabla 1.6- Recomendaciones de ingesta de ácidos grasos n-3 por autoridades internacionales	61
Tabla 1.7 - Ingestas de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 en la población española	62
Tabla 1.8- Componentes de la fibra dietética	67
Tabla 1.9 - Modelos genéticos posibles	78
Tabla 3.1 - Clasificación de peso en personas adultas según el IMC	101
Tabla 3.2 - Valores de riesgo cardiovascular según la distribución de grasa corporal	102
Tabla 3.3 - Clasificación del porcentaje de grasa corporal (%).....	103
Tabla 3.4 – Clasificación del nivel de grasa visceral	103
Tabla 3.5 - Valores de referencia de tensión arterial marcados por la Sociedad Europea de Hipertensión (ESH) y la Sociedad Europea de Cardiología (ESC)	104
Tabla 3.6 - Parámetros bioquímicos ($X \pm DT$)	105
Tabla 3.7 - Selección de polimorfismos relacionadas con la obesidad	109
Tabla 3.8 - Selección de polimorfismos relacionadas con enfermedades cardiovasculares	111
Tabla 3.9 - Selección de polimorfismos relacionados con la inflamación.....	114
Tabla 3.10 - Selección de polimorfismos relacionadas con el metabolismo lipídico	116
Tabla 3.11 - Tipos de lancetas probadas	120
Tabla 3.12 - Modelos empleados para el análisis de genotipos	129
Tabla 3.13 - Variables seleccionadas para el análisis de interacción gen-dieta.....	130
Tabla 3.14 - Criterios para determinar el riesgo de enfermedad cardiovascular	132
Tabla 3.15 – Calendario de citas	142
Tabla 3.16. Composición nutricional del desayuno estandarizado para estudio en agudo	147
Tabla 4.1 - Enfermedades asociadas, consumo de fármacos y otras sustancias en la población estudiada (%).....	154
Tabla 4.2 - Antecedentes familiares de enfermedad en la población estudiada (%)	155
Tabla 4.3 - Parámetros psicológicos y consumo de tabaco y alcohol en la población estudiada según sexo (%).....	157
Tabla 4.4 - Datos sobre el consumo de bebidas alcohólicas ($X \pm DT$)	158
Tabla 4.5 - Datos antropométricos y constantes vitales ($X \pm DT$)	159
Tabla 4.6 - Cantidades diarias cubiertas de ingesta de nutrientes y su relación con la recomendación ($X \pm DT$)	162
Tabla 4.7- Ingestas de micronutrientes ($X \pm DT$)	163
Tabla 4.8 - Raciones consumidas de los diferentes grupos de alimentos ($X \pm DT$)	164
Tabla 4.9 - Parámetros bioquímicos ($X \pm DT$)	165
Tabla 4.10 – Características genotípicas de las variantes genéticas seleccionadas.....	167
Tabla 4.11 - Variantes genéticas estudiadas en desequilibrio de ligamiento	170

Tabla 4.12 - Índice cintura - cadera según el genotipo, conforme al modelo aditivo ($X \pm DT$) .	172
Tabla 4.13 - Niveles de colesterol total LDL, CT/HDL y LDL/HDL en función de los polimorfismos de APOE*	174
Tabla 4.14 - Índice cintura-cadera según el genotipo del rs3749474 CLOCK estratificado por el grado de apetito ($X \pm DT$)	177
Tabla 4.15 - Aumento esperado del índice cintura-cadera, en función del grado de apetito con respecto a los diferentes genotipos	177
Tabla 4.16 – Modificación de los parámetros bioquímicos y biomarcadores de riesgo cardiovascular después del consumo de leche enriquecida y semidesnatada durante 12 meses	179
Tabla 4.17 – Distribución de genotipos y frecuencias alélicas en 175 sujetos con riesgo cardiovascular moderado.....	180
Tabla 4.18 - Cambios en el cociente CT/HDL entre grupos y genotipos	181
Tabla 4.19 - Cambio en parámetros bioquímicos y biomarcadores de riesgo cardiovascular después del consumo de leche semidesnatada y desnatada durante 12 meses	185
Tabla 4.20 - Distribución de genotipos y frecuencias alélicas en 161 sujetos con moderado riesgo cardiovascular.....	187
Tabla 4.21 - Cambios en el cociente CT/HDL entre grupos y genotipos	187
Tabla 4.22 - Cambios en el cociente LDL/HDL entre grupos y genotipos	188
Tabla 4.23 - Características basales de la muestra en función del grupo de aleatorización ($X \pm DT$)	191
Tabla 4.24 – Evolución de los parámetros antropométricos de la intervención	192
Tabla 4.25 – Evolución del metabolismo de la glucosa en la intervención.....	193
Tabla 4.26 – Evolución de la presión arterial y la frecuencia cardíaca en la intervención	195
Tabla 4.27 - Evolución de los parámetros bioquímicos en la intervención.....	195
Tabla 4.28 - Evolución de los parámetros de seguridad evaluados	198
Tabla 4.29 - Porcentaje de participantes que presentó alguno de los síntomas valorados por visitas y grupo.....	199
Tabla 4.30 - Evolución de la ingesta de nutrientes a lo largo del estudio por visitas y grupos ($X \pm DT$)	202
Tabla 4.31 - Puntuaciones obtenidas en la valoración sensorial en función del producto consumido ($X \pm DT$)	204
Tabla 4.32 - Distribución de genotipos y frecuencias alélicas en 85 sujetos con sobrepeso y obesidad	205
Tabla 4.33 - Variantes genéticas estudiadas en desequilibrio de ligamiento.....	208
Tabla 4.34 - Cambio de Peso e IMC.....	209

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1- Patologías asociadas a inflamación crónica de bajo grado ⁶⁶ .	48
Figura 1.2- Asociación de la apolipoproteína E con enfermedades crónicas ⁸²⁻⁸⁷ .	53
Figura 1.3- Rutas metabólicas de los ácidos grasos poliinsaturados ⁹³ .	56
Figura 1.4- Frecuencias del polimorfismo perteneciente al gen AGT (Pre-proteína de angiotensinógeno) ¹⁶⁸ .	76
Figura 1.5- Viabilidad de la identificación de variantes genéticas en base de la frecuencia de alelos y la fuerza del efecto genético (<i>odds ratio</i>) ¹⁶⁹ .	77
Figura 1.6- Genotipos de un polimorfismo de un solo nucleótido.	78
Figura 1.7- Evolución de los objetivos nutricionales a lo largo de los años.	82
Figura 3.1- Diagrama de reclutamiento y participación en el estudio.	92
Figura 3.2- Estructura de la Aplicación web de control de proyectos de la Plataforma GENYAL.	94
Figura 3.3- Compendio de genes seleccionados involucrados e interconectados con la obesidad, enfermedades cardiovasculares, inflamación y metabolismo lipídico.	118
Figura 3.4- Diferentes métodos de recogida de raspado bucal o saliva. Catálogo <i>Deltalab Eurotubo</i> 2011. http://www.isohelex.com/products/isohelex-dna-buccal-swabs/ . Oragene DNA (OG-500) http://www.dnagenotek.com/ROW/products/OG500.html	119
Figura 3.5- <i>Whatman</i> Tarjetas FTA <i>GE Healthcare</i> . http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/z719781?lang=es&region=ES	120
Figura 3.6 - Obtención de sangre capilar.	120
Figura 3.7 - Funcionamiento de las sondas <i>TaqMan</i> .	123
Figura 3.8 - Chip <i>TaqMan® OpenArray®</i> y formato empleado para el proyecto.	124
Figura 3.9 - Representación de un chip con diferentes concentraciones de ADN.	124
Figura 3.10 - Representación del resultado de genotipado de un SNP en el software <i>TaqMan® Genotyper v1.0.1</i> .	125
Figura 3.11 – Diagrama consort del estudio realizado.	140
Figura 4.1– Clasificación de la muestra según el origen geográfico (etnia).	153
Figura 4.2 – Clasificación según el consumo de cigarrillos diarios en la población estudiada por sexo (%).	157
Figura 4.3 – Clasificación según el consumo (raciones) de alcohol a la semana en la población por sexo (%).	157
Figura 4.4 – Porcentaje de la población clasificada como sedentaria de acuerdo a la Asociación Americana del Corazón en hombres y mujeres ¹⁹⁷ .	159
Figura 4.5 – Clasificación de la muestra según el diagnóstico nutricional de acuerdo al IMC ² .	160
Figura 4.6 – Clasificación del estado nutricional por sexo de acuerdo al IMC ² .	160
Figura 4.7 - Porcentaje de población con valores de grasa corporal elevadas en función del sexo.	161
Figura 4.8 – Porcentaje cubierto de la ingesta de macronutrientes y su relación con la recomendación ¹⁹⁰ .	162
Figura 4.9 - Porcentaje cubierto de vitaminas y minerales en función a las ingestas recomendadas ¹⁹⁰ .	163

Figura 4.10- Porcentaje de la población clasificada según las veces que realiza actividad física en función del genotipo según el modelo aditivo. <i>p</i> valor ajustado por 64 SNPs.	171
Figura 4.11 - Porcentaje de la población clasificada según niveles de colesterol total en sangre en función del genotipo según el modelo aditivo. <i>p</i> valor ajustado por 64 SNPs.	173
Figura 4.12 - Valores medios de los cocientes CT/HDL y LDL/HDL en función de los alelos e isoformas de APOE.	174
Figura 4.13 - Porcentaje de la población clasificada según niveles de triglicéridos en sangre en función del genotipo según el modelo dominante. <i>p</i> valor ajustado por 64 SNPs.	175
Figura 4.14 - Porcentaje de la población clasificada según la vitamina D en sangre en función del genotipo según el modelo aditivo. <i>p</i> valor ajustado por 64 SNPs.	176
Figura 4.15 - Media del índice circunferencia-cintura en función del polimorfismo rs3749474 CLOCK y el grado de apetito.	177
Figura 4.16 - Comparación del cambio en el cociente CT/HDL, en función del genotipo y el tipo de leche consumida.	183
Figura 4.17 - Desequilibrio de ligamiento (LD) de PPARA.	184
Figura 4.18 - Comparación del cambio en el cociente CT/HDL, en función del genotipo y el tipo de leche consumida.	185
Figura 4.19 - Comparación del cambio en el cociente CT/HDL, en función del genotipo y el tipo de leche consumida.	190
Figura 4.20 - Comparación del cambio en el cociente LDL/HDL, en función del genotipo y el tipo de leche consumida.	190
Figura 4.21 – Modificación de los niveles de masa grasa (kg) medida por bioimpedancia tras la intervención entre grupos/tratamiento (media, SEM).	193
Figura 4.22 – A) Modificación de la glucemia basal; B) insulinemia basal; C) Índice HOMA tras la intervención por grupo/tratamiento (media, SEM).	194
Figura 4.23 - Modificación de los niveles de colesterol total A), colesterol LDL B), y C)-D) cocientes (CT/HDL y LDL/HDL) tras la intervención por grupo/tratamiento (media, SEM).	196
Figura 4.24 - Evolución de la sensación de hambre, saciedad y deseo de comer.	197
Figura 4.25 - Evolución de la ingesta calórica total a lo largo del estudio por grupos.	200
Figura 4.26 - Evolución del ejercicio practicado expresado en METs a lo largo del estudio por grupos.	203

ABREVIATURAS

AACC:	Asociación americana de químicos de cereales, del inglés: <i>American Association of Cereal Chemist</i>
ACAT:	Acil-coenzima-A colesterol acil-transferasa
AdipoQ:	Adiponectina
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
AESAN:	Agencia Española de Seguridad Alimentaria
AGCC:	Ácidos grasos de cadena corta
AGM:	Ácidos grasos monoinsaturados
AGP:	Ácidos grasos poliinsaturados
AGS:	Ácidos grasos saturados
AHA:	Asociación Americana del Corazón, del inglés: <i>American Heart Association</i>
ApoA1:	Apolipoproteína A1
ApoB:	Apolipoproteína B
ApoE:	Apolipoproteína E
ARN:	Ácido ribonucleico
ARNm:	ARN mensajero
ATP:	Adenosín trifosfato
BIA:	Bioimpedancia
BLC :	Bebida láctea control
BLE:	Bebida láctea estudio
Cad:	Circunferencia de la cadera
Cci:	Circunferencia de la cintura
COX:	Ciclooxigenasa
CT:	Colesterol total
DHA:	Ácido docosahexaenoico
DT:	Desviación típica o estándar
EFSA:	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
ENIDE:	Encuesta Nacional de Ingesta Dietética
ENPE:	Estudio nutricional de la población española
ENRICA:	Estudio de Nutrición y Riesgo Cardiovascular en España
EPA:	Ácido eicosapentaenoico
ESC:	Sociedad Europea de Cardiología
ESH:	Sociedad Europea de Hipertensión
FABP2:	Proteínas transportadoras de ácidos grasos
FAO:	Organización de las Naciones Unidas para la agricultura
FC:	Frecuencia cardiaca
FDA:	Administración de alimentos y drogas, del inglés: <i>Food and Drug Administration</i>
FID:	Federación Internacional de Diabetes
GEAF:	Gasto de Energía por Actividad Física
GOT-AST:	Transaminasa Glutámico-oxalacética
GPT-ALT:	Transaminasa Glutamicopirúvica
GRASS:	En general reconocido como seguro, del inglés: <i>Generally Recognized As Safe</i>
HbA1c:	Hemoglobina glicosilada
HDL:	Lipoproteínas de alta densidad
HOMA:	Índice de resistencia a la insulina, del inglés: <i>Homoeostasis Model Assessment</i>

HTA:	Hipertensión arterial
HWE:	<i>Hardy-Weinberg</i>
IC:	Intervalo de confianza
ICAM-1:	Molécula de adhesión intracelular 1
IDA:	Dosis diaria aceptada, del inglés: <i>Intake Doses Accepted</i>
IDL:	Lipoproteínas de densidad media
IFN- γ :	interferón gamma
IL:	Interleuquina
IMC:	Índice de masa corporal
IR:	Ingestas recomendadas
LD:	Desequilibrio de ligamiento, del inglés: <i>Linkage Disequilibrium</i>
LDL:	Lipoproteínas de baja densidad
LEP:	Leptina
LOX:	Lipooxigenasa
LT:	Leucotrieno
MET:	Equivalente metabólico que equivale en torno a 1 Kcal/kg/h y que supone aproximadamente el gasto de energía en un estado de reposo
NHLBI:	Instituto Nacional del Corazón, Pulmón y la Sangre americano, del inglés: <i>National Heart, Lung and Blood Institute</i>
NOAEL:	Índice de toxicidad, del inglés: <i>No Observed Adverse Effect Level</i>
OMS:	Organización Mundial de la Salud
OR:	<i>Odds Ratio</i>
PAD:	Presión arterial diastólica
PAI-1:	Plasminógeno tisular
PAS:	Presión arterial sistólica
PC:	Prostaciclina
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PCR:	Proteína C reactiva
PG:	Prostaglandina
PGI ₂ :	Prostaglandina I ₂
PPAR γ :	Receptores activadores de la proliferación de peroxisomas y
SCF:	Comité Científico de la Alimentación Humana de la Comisión Europea, del inglés: <i>Scientific Committee on Food</i>
SEEDO:	Sociedad Española del Estudio de la Obesidad
SELE:	Selectina E
SM:	Síndrome Metabólico
SNP:	Polimorfismo de un solo nucleótido, del inglés: <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SUN:	Seguimiento Universidad de Navarra
TG:	Triglicéridos
TNF- α :	Factor de necrosis tumoral alfa
TX:	Tromboxano
TXA ₂ :	Tromboxano A ₂
UAM:	Universidad Autónoma de Madrid
VCT:	Valor calórico total
VLDL:	Lipoproteínas de muy baja densidad
WHO:	Organización Mundial de la Salud, del inglés: <i>World Health Organization</i>

1. INTRODUCCIÓN

1 INTRODUCCIÓN

1.1 ENFERMEDADES RELACIONADAS CON LA NUTRICIÓN

Las enfermedades crónicas, también denominadas enfermedades no transmisibles, cada vez son más prevalentes en la sociedad actual. Estas se caracterizan por ser enfermedades de duración larga y por lo general de progresión lenta, donde se encuentran las enfermedades cardiovasculares, respiratorias, la obesidad, la diabetes o el cáncer. Este tipo de enfermedades suponen un problema de salud pública ya que constituyen las principales causas de mortalidad en el mundo, siendo responsables de aproximadamente el 63% de las defunciones¹.

Dichas enfermedades se encuentran relacionadas con la alimentación, a la vez que están también interconectadas entre sí mediante mecanismos complejos, siendo en muchas ocasiones cada una de ellas, un factor de riesgo de desarrollar otra. Entre las enfermedades crónicas existentes, en este trabajo se destaca la obesidad y la enfermedad cardiovascular, entre ellas relacionadas mediante dos denominadores comunes, la inflamación y las alteraciones a nivel lipídico.

1.1.1 OBESIDAD

1.1.1.1 *Definición y clasificación*

La obesidad es considerada como un trastorno metabólico crónico, caracterizado por un aumento del peso corporal con respecto al valor esperado en función del sexo, talla y edad, el cual está asociado a una acumulación excesiva de grasa en el organismo ². La Organización Mundial de la Salud (OMS) define el sobrepeso y la obesidad como una acumulación anormal o excesiva de tejido adiposo que puede ser perjudicial para la salud ³. Sin embargo, aparte del grado de exceso de grasa que almacenan los sujetos obesos, la obesidad también está determinada por la región en la que se distribuye la grasa en el cuerpo. Por ello, el grado de exceso de grasa y su distribución en el organismo, determinan consecuencias sobre la enfermedad y varían considerablemente entre los individuos obesos, por lo que el diagnóstico de la obesidad debe complementarse con el conocimiento de la distribución de grasa corporal de los sujetos analizados ⁴.

La obesidad según la OMS, se clasifica de acuerdo al Índice de Masa corporal (IMC) o también denominado Índice de *Quetelet*, que constituye una medida de asociación entre la masa en kilogramos (kg) y la talla en metros (m²) de un individuo, representada mediante la siguiente formula ³:

$$\text{IMC (kg * m}^{-2}\text{)} = \frac{\text{Masa (kg)}}{\text{Talla (m}^2\text{)}}$$

Un Índice de Masa Corporal mayor o igual a 30 (kg/m²) es clasificado como obesidad, existiendo diferentes grados en función del valor del IMC ³.

Determinar la cantidad y distribución de tejido adiposo en el sujeto obeso resulta de especial relevancia. En 1947, Vague ya clasificó la obesidad en función de la localización de la grasa como obesidad de tipo androide o de tipo ginoide ⁵. Según la Sociedad Española del Estudio de la Obesidad (SEEDO), la distribución del tejido adiposo en sujetos con obesidad se clasifica de la siguiente manera ⁶:

Obesidad androide: el tejido adiposo se localiza mayoritariamente en la región del tronco superior y región abdominal y a su vez, puede clasificarse en:

- Obesidad androide con disposición de tejido adiposo subcutáneo a nivel abdominal.
- Obesidad androide en la que la distribución del tejido adiposo se presenta mayoritariamente localizada alrededor de la región visceral.

Obesidad ginoide: el tejido adiposo se encuentra localizado mayoritariamente en la región glúteo-femoral, lo que ha sido asociado con menos alteraciones metabólicas que en el caso de la obesidad androide, sin embargo, se ha asociado a más a problemas mecánicos.

Obesidad de distribución homogénea: el tejido adiposo se encuentra distribuido por el cuerpo sin predominar en ninguna región concreta.

1.1.1.2 Prevalencia

Aunque se conocen evidencias de que ya existían casos de sobrepeso y obesidad hace miles de años, en la era paleolítica ⁷, actualmente su prevalencia alcanza niveles de epidemia según la OMS, afectando a más de un billón de adultos a nivel mundial, lo que se ha convertido en uno de los principales problemas de salud pública en los países desarrollados y en vías de desarrollo. La prevalencia de la obesidad se ha triplicado en muchos países europeos desde

1980 y el número de casos sigue en aumento. A su vez, cabe destacar que la prevalencia de esta enfermedad varía en los diferentes países ⁸.

En el caso de España, los resultados del estudio “enKid” ⁹ diseñado para evaluar los hábitos alimentarios y el estado nutricional de la población infantil y juvenil, aporta resultados sobre la prevalencia de obesidad en una población de entre 2 y 24 años de edad. Este estudio muestra que la prevalencia de esta patología es del 13.90 %, y un 12.40 % para el sobrepeso, lo que tipifica al 26.30 % de la población española entre 2 y 24 años con sobrecarga ponderal ¹⁰. Por otro lado, según el estudio ENPE (Estudio Nutricional de la Población Española 2014-2015), la prevalencia de sobrepeso en la población adulta española de entre 25 y 64 años, en nuestro país se estima en un 39.30 %, (IC95 %: 35.70 - 42.90). La obesidad general del total de la población se estima en un 21.60%, (IC95 %: 19.00 - 24.20), donde los hombres representan un 22.80% y las mujeres un 20.50 %. Además, este estudio presenta una prevalencia de obesidad abdominal para el total de la población en un 33.40%, (IC95 %: 31.10 - 35.70), siendo mayor entre las mujeres 43.30 %, frente a un 23.30 % en los hombres. Según los estudios realizados se observa que tanto los niveles de obesidad general como abdominal aumentan con la edad ¹¹.

1.1.1.3 Fisiopatología

La obesidad se caracteriza por un desequilibrio entre el aporte de energía proporcionado por la metabolización de los macronutrientes y el gasto energético producido por el sujeto ¹². Concretamente, el desequilibrio en este balance, por un exceso de energía que no resulta compensado por el gasto, se transforma en grasa y se acumula en el organismo. Este desequilibrio puede deberse a un aumento de la ingesta energética, a una disminución del gasto energético, o a ambas situaciones a la vez ¹³.

En la regulación de la ingesta y gasto energético participan diferentes estructuras y sistemas tales como el sistema nervioso, el digestivo, así como el adiposo ¹². A su vez, también influyen factores emocionales, sociales y del comportamiento, lo cual constituye una sistema complejo de regulación ¹⁴.

Desde el punto de vista de la ingesta energética, el aumento puede producirse debido al hambre, que es el instinto producido por la necesidad global biológica de nutrientes, estando regulado por mecanismos homeostáticos que tienen lugar en el hipotálamo; o debido al apetito, que es la intelectualización del instinto del hambre, influenciado por el medio social ¹⁵. Por otro lado, la ingesta dietética está influenciada por otros dos factores relacionados con la

capacidad de inhibir el hambre: la saciedad y la plenitud. La saciedad es un proceso que tiene lugar después de haber ingerido alimentos y controla los periodos de ayuno e ingesta. Cada alimento tiene una eficacia referente a la saciedad que produce una mayor o menor cantidad de dicho estímulo. Entre los aspectos que se han relacionado con la saciedad se encuentran el índice glucémico de los alimentos ¹⁶, la presencia de almidón resistente o la presencia de enzimas inhibidoras de α amilasa ¹⁷. A su vez, la plenitud, está referida al control del volumen de comida ingerida, así como la duración en el tiempo ¹⁵.

La regulación de la ingesta de alimentos a nivel del sistema nervioso, que ejerce efectos sobre la sensación de hambre y la saciedad, se produce en diferentes regiones como el hipotálamo, la corteza y tallo cerebral ¹⁸. Por otro lado, el hambre y la saciedad también están regulados por otros sistemas como el digestivo y el tejido adiposo.

A nivel gastrointestinal, existen diferentes moléculas que ejercen un efecto regulador sobre la ingesta dietética, tales como la grelina que ejerce un efecto orexigénico y regula el comportamiento alimentario, desencadenando el inicio de la ingesta ¹⁹. Sus niveles en plasma están inversamente relacionados con el IMC y se ha comprobado que, en personas obesas, los niveles de grelina se normalizan o aumentan después de la pérdida de peso ²⁰. El péptido YY actúa directamente inhibiendo la liberación del neuropéptido Y, a la vez que actúa estimulando la producción de un fragmento del péptido anorexígeno de la proopiomelanocortina (POMC) ²¹. La insulina también juega un papel regulador, ya que es una hormona segregada por las células β del páncreas que regula el apetito inhibiendo la ingesta ²², a la vez que incrementa centralmente la actividad simpática y el gasto energético.

Por otro lado, el tejido adiposo libera adipoquinas, como la leptina (LEP), adiponectina (AdipoQ), interleuquina 1b (IL-1b), interleuquina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), que regulan el apetito y el balance energético²³.

1.1.1.4 *Complicaciones de la obesidad*

Se ha observado mediante estudios epidemiológicos, que la mortalidad aumenta cuando el IMC sobrepasa los 25 kg/m² ^{24,25}. A medida que el IMC aumenta en la población, el grado de mortalidad crece de forma directamente proporcional ²⁵. Así, se estima que sujetos con IMC superior o igual a 30 kg/m² tienen aumentado el riesgo de mortalidad total entre aproximadamente el 50 y el 100 %, comparados con la población en normopeso ²⁴.

En la tabla 1.1 se muestran diferentes alteraciones asociadas al sobrepeso y la obesidad.

Tabla 1.1 - Alteraciones asociadas al sobrepeso y obesidad.
• Algunos tipos de cáncer
• Alteraciones menstruales
• Alteraciones psicológicas
• Colelitiasis
• Diabetes <i>mellitus</i> tipo 2
• Dislipemia
• Enfermedad coronaria y cerebrovascular
• Insuficiencia cardíaca
• Hipertensión
• Osteo-artrosis
• Síndrome de apnea del sueño
Fuente: ²⁶

Otro de los procesos patológicos asociados a la obesidad, en concreto a la obesidad abdominal, es el denominado síndrome metabólico (SM) que aumenta conforme aumentan los casos de obesidad y estilos de vida sedentarios. Al igual que la obesidad, el SM se ha convertido en un problema clínico y de salud pública que además duplica el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares e incrementa en cinco veces el riesgo de padecer diabetes *mellitus* tipo 2 ²⁷⁻²⁹.

Dados los múltiples factores que condicionan el síndrome metabólico, ponerse de acuerdo sobre cómo definir el diagnóstico, ha resultado un tema complicado durante varios años. Según el acuerdo entre la Federación Internacional de Diabetes (FID), la Asociación Americana del Corazón (AHA) y el Instituto Nacional del Corazón, Pulmón y la Sangre americano (NHLBI), se ha considerado que la obesidad abdominal no debe ser un prerrequisito para su diagnóstico, pero si representa uno de los cinco propuestos que son: perímetro abdominal aumentado, hipertrigliceridemia, disminución HDL, hipertensión arterial y glucosa alterada en ayunas. En base a estos requisitos, acordaron que la presencia de 3 de los 5 factores mencionados da lugar al diagnóstico del síndrome metabólico ³⁰.

Por otro lado, la obesidad puede constituir un estado crónico de estrés oxidativo. De esta manera, la obesidad genera elevaciones de los marcadores de peroxidación lipídica o de oxidación proteica y, este estrés oxidativo puede ser el mecanismo que subyace en las comorbilidades de la obesidad. En concreto, la obesidad central es la que está asociada con un mayor riesgo a dichos procesos. ^{31,32}

1.1.1.5 Factores de riesgo

Puesto que la obesidad es una enfermedad compleja, pueden llegar a ser muchos los factores desencadenantes de dicha patología. Entre los factores predisponentes de la obesidad se han establecido ³³:

- Factores psicológicos tales como depresión y ansiedad.
- Factores hormonales que influyen sobre la homeostasis energética y grado de apetito.
- Factores ambientales donde se incluyen los hábitos dietéticos aprendidos en la infancia, el nivel sociocultural, económico y hábitos de actividad física.
- Factores genéticos que predisponen a la obesidad mediante la regulación del gasto energético y el contenido de tejido graso.
- Tratamientos farmacológicos con glucocorticoides, antidepresivos tricíclicos y estrógenos.
- Enfermedades tales como ovario poliquístico o síndrome de *Stein-Leventhal*, el síndrome de Cushing, el hipotiroidismo, el hipogonadismo, el síndrome de *Carpenter*, el síndrome de Cohen, la acromegalia, lesión hipotalámica, cromosoma X frágil, etc.

A su vez, existen otras situaciones que, debido a los cambios que producen, pueden desencadenar obesidad. Entre ellos se encuentran ³⁴:

- El periodo de menarquia debido a los cambios hormonales.
- Durante el embarazo y la lactancia, donde se producen también cambios hormonales, sobre todo en los casos que se acompañan de un exceso de ingesta o una reducción el gasto energético en reposo.
- Abandono del hábito tabáquico, ya que la nicotina provoca un efecto anorexígeno sobre el organismo y estimula del gasto calórico, a la vez que su abandono provoca un aumento de ansiedad.
- Supresión de actividad física que conduce a una reducción del gasto energético, si no se acompaña de una reducción de la ingesta calórica.

Los avances en genética y los estudios sobre los mecanismos moleculares por los que se desarrolla la obesidad, han permitido generar nuevas estrategias en la prevención y el tratamiento de la misma. No obstante, el mecanismo de regulación del peso corporal, está caracterizado por una gran complejidad debido a los múltiples procesos implicados, en donde se han llegado a relacionar más de 600 genes o regiones cromosómicas con esta patología ^{35,36}.

Estas localizaciones se encuentran distribuidas por prácticamente todos los cromosomas del genoma humano. El único cromosoma donde de momento no se han encontrado marcadores asociados con la obesidad, es el cromosoma Y³⁷. Esto es debido a que los genes asociados a la obesidad se encuentran implicados en una gran variedad procesos metabólicos entre los que se encuentran la regulación del apetito, la termogénesis, adipogénesis, inflamación y el metabolismo lipídico.

1.1.1.6 *Tratamiento*

Los tratamientos para el manejo de la obesidad, aparte de estar enfocados a la disminución de peso y grasa corporal, también están dirigidos a mejorar las comorbilidades asociadas al exceso de peso. Entre las estrategias para el tratamiento se encuentran la dietoterapia, la educación nutricional, la práctica de ejercicio físico, todos ellos dentro de lo que supone un cambio en los estilos de vida del paciente³⁸. A su vez, también existen otro tipo de acciones utilizadas en el tratamiento como es el caso de la cirugía bariátrica o el empleo de medicamentos.

Dentro de la dietoterapia aplicada a la pérdida de peso se aplican dietas hipocalóricas³⁸, resultando la mejor alternativa para el tratamiento dietético de esta patología. En general se adaptan reduciendo entre 500 y 1000 Kcal de energía al día, manteniendo los porcentajes de macronutrientes, disminuyendo principalmente la cantidad de grasas de la dieta o aumentando el porcentaje de proteínas en la misma³⁹.

Sin embargo, a veces el tratamiento dietético resulta poco satisfactorio para el paciente y no se consigue establecer un balance energético adecuado a lo largo del tiempo, ya que las restricciones dietéticas conducen a altas tasas de abandono y fracaso del tratamiento. No obstante, la existencia cada vez más amplia en el mercado de alimentos funcionales, permite mejorar la variedad de la dieta y por tanto reducir la monotonía vinculada a las pautas dietéticas de pérdida de peso, a la vez que constituyen vehículos de elementos bioactivos con un posible efecto para mejorar la salud⁴⁰.

1.1.1.7 *Prevención*

Dentro de las medidas aplicadas para la prevención de la obesidad destaca la prevención en las primeras etapas de la vida, ya que es desde los primeros momentos, dónde se van a establecer los hábitos de estilo de vida, que incluyen una alimentación saludable y la práctica de actividad física. Para ello, se hace imprescindible poner al alcance de la población programas de educación nutricional para generar conocimientos y aplicar hábitos alimentarios adecuados. Por otro lado, otra medida para prevenir esta patología en toda la población es la promoción de actividad física y deporte en la población como hábito de estilo de vida.

1.1.2 ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

1.1.2.1 *Definición y clasificación*

Las enfermedades cardiovasculares engloban varias patologías que afectan tanto al corazón como a los vasos sanguíneos. Según la OMS, las enfermedades cardiovasculares se clasifican en: cardiopatía coronaria, reumática y congénita, enfermedad cerebrovascular, enfermedad vascular periférica, insuficiencia cardíaca, miocardiopatías e hipertensión arterial ⁴¹. Según la Asociación Americana del Corazón (AHA), las enfermedades cardiovasculares engloban la cardiopatía coronaria (que incluye la arteriopatía coronaria e isquémica), el ictus o accidente cerebrovascular, la hipertensión arterial y la cardiopatía reumática ⁴². De todas estas patologías, cabe destacar la cardiopatía isquémica y la enfermedad cerebrovascular ya que estas causan en torno al 60 % de todas las muertes de tipo cardiovascular ⁴³.

En el caso de la cardiopatía coronaria, las principales manifestaciones clínicas son la angina de pecho (dolor torácico que resulta de la alteración del flujo sanguíneo cardíaco) y el infarto agudo de miocardio, el cual puede llegar a producir la muerte en la tercera parte de los casos. La cardiopatía coronaria está provocada por el estrechamiento de las arterias de manera que el corazón no puede recibir suficiente sangre y oxígeno. Por tanto, una arteria bloqueada puede causar un ataque cardíaco. Con el tiempo, la cardiopatía coronaria a su vez, puede debilitar el miocardio y provocar insuficiencia cardíaca o arritmias⁴².

La insuficiencia cardíaca se produce cuando el músculo cardíaco se debilita o se vuelve rígido, de manera que no puede bombear de forma adecuada sangre oxigenada, y por tanto causa

síntomas en todo el cuerpo. La enfermedad puede afectar tanto al lado derecho como al lado izquierdo del corazón⁴².

En el caso de los accidentes cerebrovasculares, estos pueden ser isquémicos o hemorrágicos. El accidente cerebrovascular isquémico se produce cuando un vaso sanguíneo que irriga al cerebro se bloquea por un coágulo de sangre debido a que la arteria está estrechada (accidente cerebrovascular isquémico), o porque el trombo se mueve de otras partes del organismo hacia los vasos vertebrales (accidente cerebrovascular embólico).

Tanto la cardiopatía coronaria como la enfermedad cerebrovascular suelen desencadenarse debido a la arteriosclerosis, que provoca la rigidez de las arterias y su engrosamiento debido a la acumulación de colesterol, grasas y otras sustancias. Este proceso provoca la disminución de la circulación por los vasos sanguíneos que puede llegar a bloquearse.

Por otro lado, la hipertensión arterial (HTA) cursa con una elevación excesiva de los niveles sanguíneos de presión dentro de las arterias, que produce un deterioro de las mismas endureciéndolas y promoviendo a su vez la arteriosclerosis. La hipertensión sostenida en el tiempo, además genera un esfuerzo extra al corazón el cual se debilita con el tiempo pudiéndose producir insuficiencia cardíaca ⁴².

Existen varias clasificaciones que definen los rangos de hipertensión arterial y que atienden al riesgo sobre la salud de estos valores. En general se considera una presión arterial elevada cuando se detectan niveles de presión sistólica mantenidas por encima de 139 mmHg, o unos niveles de presión diastólica mantenidas mayores a 89 mmHg ⁴².

1.1.2.2 *Prevalencia*

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte a nivel mundial, lo que ha supuesto en 2012 en torno a un 31 % de muertes totales registradas y que supone unos 7.20 millones de muertes por cardiopatía coronaria y 6.70 millones de muertes por accidentes cerebrovasculares o ictus. ⁴⁴

España es un país con una mortalidad media-baja por enfermedades cardiovasculares, lo cual ha supuesto prácticamente un tercio (31.19 %) del total de defunciones en el año 2009, en comparación con otros países europeos (42.00 % de las muertes totales) ⁴⁵. Se ha observado que la prevalencia de este tipo de enfermedades es mayor en los países del este y norte de

Europa en comparación con la de los países del sur y cuenca mediterránea ⁴⁶. Sin embargo, se prevé un aumento progresivo de estas cifras, debido al envejecimiento progresivo de la población, así como debido al aumento de los factores de riesgo causados por estilos de vida sedentarios y no saludables, así como por el aumento de enfermedades crónicas ⁴².

Al igual que en la población mundial, la cardiopatía coronaria y las enfermedades cerebrovasculares son la principal causa de muerte en nuestro país. En el caso de las mujeres, la primera causa de muerte es debida a las enfermedades cerebrovasculares y en el caso de los hombres la principal causa de muerte es debida a la cardiopatía coronaria ⁴².

Con respecto a la hipertensión arterial, es una de las enfermedades crónicas más frecuentes de la población lo que supone un riesgo de complicaciones coronarias. En general, es más frecuente en hombres que en mujeres. Según los datos recogidos en España en torno al 45 % de la población entre 35 y 64 años padece hipertensión y un porcentaje no está diagnosticado. Además, de cada diez personas que son diagnosticadas con hipertensión arterial, tres no reciben un tratamiento farmacológico antihipertensivo ⁴².

1.1.2.3 *Fisiopatología*

La cardiopatía coronaria se caracteriza por la afectación de las arterias que rodean el corazón, que se encargan de hacer llegar sangre a dicho órgano. El musculo cardiaco, al igual que el resto de tejidos requieren de sangre cargada de oxígeno para funcionar. Las lesiones en las arterias coronarias suponen una disminución de flujo de oxígeno y nutrientes hacia el corazón generando riesgo de infarto u otro tipo de complicaciones ⁴².

Las arterias, están formadas por células endoteliales que están en contacto con el torrente sanguíneo. Aparte de permitir la permeabilidad vascular para el intercambio de nutrientes entre la sangre y el resto de órganos, también ejercen una función de mantenimiento a nivel vascular. Seguida de la capa intima, se encuentra la capa media compuesta por células musculares lisas y elásticas. Por último, la capa más externa está formada por tejido conjuntivo ⁴².

El endotelio, ejerce la función de permeabilidad, además de contribuir a la regulación del tono vascular mediante la dilatación, vasoconstricción y reparación de los vasos sanguíneos. A su vez, interviene en procesos de coagulación, inflamación y procesos inmunológicos ⁴².

En el caso de los accidentes cerebrovasculares, una región del cerebro se queda sin riego sanguíneo lo que provoca la lesión o muerte de esa zona. Este hecho puede producirse debido a varias causas: por una obstrucción de una arteria cerebral debido a la arteriosclerosis y a la formación de un coagulo sanguíneo (lo que se conoce como trombosis cerebral). Esto puede producirse por la rotura de una arteria cerebral produciéndose una hemorragia cerebral (hecho asociado a la hipertensión arterial), o puede producirse debido a la obstrucción de una arteria cerebral debido a un trombo que ha llegado hasta allí desde otras partes del cuerpo, lo que se denomina embolia cerebral. En función de la localización dónde se produzca el accidente cerebrovascular, se puede producir una lesión con alteración neurológica o incluso la muerte repentina ⁴².

Los principales procesos que tienen lugar en la enfermedad cardiovascular son la aterosclerosis, que consiste en la acumulación de una placa de ateroma en las arterias, y la arteriosclerosis que consiste en el endurecimiento de las arterias. Estos procesos provocan un estrechamiento progresivo de las arterias, disminuyendo el caudal de sangre que circula por las mismas. El proceso aterosclerótico se va produciendo a lo largo de los años y comienza con pequeñas acumulaciones de colesterol LDL en la capa endotelial de la arteria. Con el objetivo de retirar estas moléculas, los macrófagos se infiltran en la capa endotelial y se transforman en células espumosas debido a la acumulación de colesterol en su interior. Con el tiempo, se van acumulando un mayor número de lípidos en las paredes, así como células espumosas muertas, linfocitos y monocitos que contribuyen a disminuir la luz de la arteria. Esta acumulación de moléculas es rodeada por tejido conjuntivo, colágeno y fibras musculares lisas, produciéndose aún más estrechamiento de la arteria. Una fase final consiste en la rotura del endotelio y la liberación de las moléculas a la luz de la arteria generando un trombo que puede llegar a causar un infarto agudo de miocardio ⁴².

La trombosis, consiste en la formación de un coagulo de sangre que bloquea de forma parcial o total el interior de las arterias y venas, más frecuentemente del cerebro y de las extremidades. Los trombos están constituidos principalmente por plaquetas que se activan cuando hay una fisura en los vasos sanguíneos. Las plaquetas se unen entre sí mediante el fibrinógeno y forman una red junto con la fibrina formando un trombo. La causa más frecuente de trombos es la aterosclerosis, aunque existen otros factores como la hipertensión, obesidad, sedentarismo, fármacos etc., que también favorecen los procesos trombóticos. El proceso de trombosis se caracteriza por la activación de plaquetas que liberan tromboxanos A₂ entre otros compuestos y, ejercen una función vasoconstrictora, activadora de plaquetas y de agregación de plaquetas de forma irreversible. Este fenómeno provoca que la luz del vaso se

cierre y que las plaquetas se adhieran más fácilmente. A continuación, se produce una adhesión celular y una agregación plaquetaria en la pared lesionada. Las plaquetas se agregan entre sí mediante el fibrinógeno.

Cuando las placas de ateroma se rompen, las plaquetas lo reconocen como una lesión vascular, se adhieren y comienzan a formar trombos de fibrina y plaquetas que solucionan la lesión vascular. Sin embargo, en sujetos con aterosclerosis donde la luz de las arterias está disminuida, pueden provocar un accidente coronario o cerebral ⁴².

1.1.2.4 Factores de riesgo

Dentro de los factores de riesgo asociados a la enfermedad cardiovascular existen algunos que se pueden modificar. Este es el caso del perfil lipídico en sangre, los niveles de hipertensión arterial o el tabaquismo. Otros factores como la edad, el género o factores genéticos de susceptibilidad al desarrollo de estas alteraciones, sin embargo no son modificables.

En el caso de los factores modificables, los hábitos de estilo de vida como el consumo de tabaco aumentan el riesgo de eventos cardiovasculares y muerte súbita en comparación con los no fumadores. Dentro de los estilos de vida que también influyen sobre este tipo de patologías se encuentra el estilo de vida sedentario. Además, patologías como la obesidad, la diabetes o la hipertensión, también tienen aumentado el riesgo de eventos cardiovasculares ⁴⁷.

En el caso de los factores no modificables se encuentran la edad, que a medida que esta aumenta, el riesgo cardiovascular también. El sexo también influye, ya que como se ha comentado anteriormente, los hombres tienen más riesgo de sufrir cardiopatía coronaria y las mujeres accidentes cerebrovasculares.

Además, también existen los factores genéticos que suelen estar ligados a antecedentes familiares de dichas patologías. Al igual que en el caso de la obesidad, el desarrollo de patologías cardiovasculares es debido a causas multifactoriales donde se encuentran implicados una gran cantidad de genes, que unidos a los factores ambientales, desencadenan los procesos patológicos.

Para determinar los factores genéticos involucrados en las patologías cardiovasculares, es necesario el estudio de genes que participan en la regulación del metabolismo lipídico, de la homocisteína, en el proceso inflamatorio a nivel vascular y adhesión celular, así como los

involucrados en la oxidación^{35,48}. Dado el número de genes involucrados en los procesos asociados a la enfermedad cardiovascular su estudio tiende a llevarse a cabo mediante estudio de asociación del genoma completo ⁴⁹.

1.1.2.5 *Tratamiento*

El tratamiento de las enfermedades cardiovasculares va a depender del tipo y gravedad de las mismas. Sin embargo, las pautas de alimentación saludable y actividad física regular, se encuentran dentro de todas las recomendaciones. A su vez, se recomiendan los controles frecuentes de colesterol y triglicéridos y un control periódico de la presión arterial.

Por otro lado, también se emplean fármacos para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares, los cuales actúan sobre el funcionamiento del corazón y de la circulación sanguínea, sin embargo, la respuesta a este tipo de tratamientos depende del paciente y resulta a veces complicado saber con exactitud que tratamiento farmacológico es el más adecuado, además de no estar exentos de efectos secundarios y contraindicaciones.

Existen diferentes familias de medicamentos para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares entre los que se encuentran:

- Fármacos hipolipemiantes tales como los fibratos, ácido nicotínico, ecetimiba, atorvastatina, simvastatina y pravastatina, los cuales disminuyen los niveles de colesterol y triglicéridos en sangre.
- Betabloqueantes tales como el atenolol, propranolol, carvedilol, bisoprolol, metoprolol y nebivolol, los cuales disminuyen la frecuencia de contracción del corazón y el trabajo que éste necesita realizar para bombear la sangre.
- Diuréticos tales como la furosemida, torasemida, hidroclorotiacida, clortalidona, amiloride y espironolactona, los cuales ayudan a reducir la presión arterial mediante la eliminación de líquidos y sales minerales.
- Bloqueantes de los canales de calcio o calcio-antagonistas que provocan que el corazón se contraiga con menos fuerza y, que las arterias se relajen y ejerzan menos presión sobre la sangre que tienen en su interior.
- Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina los cuáles relajan las arterias, por lo que disminuyen la tensión arterial, así como el trabajo que debe realizar el corazón para bombear la sangre.

- Antagonistas de los receptores de angiotensina II, similares a los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina.

A su vez a parte de los medicamentos, cabe destacar que actualmente también existen en el mercado diferentes tipos de alimentos funcionales, enfocados al mantenimiento y mejora del perfil lipídico del consumidor, constituyendo por tanto una herramienta más para el tratamiento. Una adecuada selección de alimentos funcionales o nutraceuticos, puede complementar la acción farmacológica especialmente cuando la respuesta a los medicamentos no es del todo eficaz.

1.1.2.6 *Prevención*

La prevención de enfermedades cardiovasculares resulta imprescindible para disminuir los casos de defunciones por cardiopatía coronaria y accidentes cerebrovasculares. Por ello, se han planteado diferentes objetivos de prevención para mantener un riesgo reducido o disminuirlo en sujetos cuyo riesgo sea elevado.

Entre las medidas de prevención se encuentra el no consumir tabaco, realizar una alimentación saludable, practicar ejercicio de forma constante y moderada, mantenerse en un peso adecuado evitando la obesidad abdominal, controlar los niveles de presión arterial ⁵⁰, así como controlar el perfil lipídico manteniendo niveles de colesterol LDL inferiores a 130 mg/dl (3.4mmol/l) ⁵¹ y niveles de glucemia por debajo de < 110 mg/dl (6 mmol/l) ⁵².

De esta manera, un adecuado mantenimiento de los niveles de lípidos en sangre, puede llegar a provocar una reducción del 10 % del colesterol total en plasma asociado a una reducción del 25 % en la incidencia de enfermedad arterial coronaria después de cinco años ⁵³. Por otro lado, una reducción del colesterol LDL de aproximadamente 40 mg/dl se acompaña de una disminución del 20 % en los episodios de cardiopatía isquémica ⁵⁴.

En el caso del hábito tabáquico, está claramente establecida la relación entre el consumo de esta sustancia tanto de forma pasiva como activa y los perjuicios sobre la salud, los cuales aumentan sinérgicamente con la edad, la hipertensión arterial y la diabetes ⁵⁵.

El riesgo de enfermedad cardiovascular está vinculado a la elevación de la presión arterial en personas obesas, así como a las alteraciones que se producen en el perfil lipídico, aumentando el colesterol LDL y disminuyendo del colesterol HDL ⁴⁷. A su vez, se ha determinado la relación

existente entre la obesidad abdominal, el perímetro de cintura elevado y el riesgo cardiometabólico (más de 102 cm en varones y más de 88 cm en mujeres) ⁵⁶.

Estilos de vida sedentarios contribuye a aumentar el riesgo cardiovascular. Se piensa que la práctica de actividad física de forma regular en la edad adulta puede aumentar la esperanza de vida en unos 1.3 y 3.7 años ⁵⁷.

Por otro lado, la hipertensión arterial supone en sí mismo un factor de riesgo de cardiopatía isquémica y accidente cerebrovascular, aumentando los casos de estas enfermedades de forma lineal con respecto a la subida de presión arterial ⁵². Datos longitudinales aportados por estudio de *Framingham* indican que los valores de presión arterial de 130-139 mmHg de presión sistólica y 85-89 mmHg de presión diastólica se asocian a un aumento en el riesgo relativo de enfermedad cardiovascular, cuando es comparado con valores inferiores a 120/80 mmHg ⁵⁸. Entre los factores que promueven la hipertensión arterial se encuentran el hábito tabáquico, el colesterol plasmático elevado, consumo elevado de sal, consumo elevado de grasas saturadas y alcohol, así como los antecedentes familiares.

Por último, los factores psicosociales como niveles socioeconómicos bajos, poco apoyo social, estrés laboral y familiar, así como la depresión y emociones negativas, también suponen un factor de riesgo a nivel cardiovascular ⁵⁹.

1.2 PROCESOS METABÓLICOS ASOCIADOS CON ENFERMEDADES RELACIONADAS CON LA NUTRICIÓN

1.2.1 ENFERMEDAD CRÓNICA Y PROCESO INFLAMATORIO

Actualmente, las enfermedades crónicas o también calificadas como no transmisibles, constituyen una epidemia a nivel mundial que produce cada vez más causas de discapacidad y muerte prematura, además de afectar a la calidad de vida de población. Concretamente, en nuestro país suponen hoy en día el 80 % del gasto sanitario, sospechándose que en 2030 llegará a doblarse la incidencia actual de estas enfermedades ⁶⁰. Dichas patologías se encuentran estrechamente relacionadas con los cambios en los hábitos de alimentación y en los estilos de vida de la población, unidos a un mayor control de las enfermedades infecciosas así como al aumento de la esperanza de vida ^{61,62}.

Un factor común que relaciona las enfermedades crónicas entre sí, está caracterizado por un estado inflamatorio crónico de bajo grado o subclínico en el organismo humano ⁶³.

Aunque los fenómenos de inflamación se atribuyen en primera instancia a enfermedades infecciosas o lesiones de tejidos, las investigaciones sobre patologías de tipo no infeccioso como la obesidad y las enfermedades cardiovasculares, han determinado el proceso inflamatorio crónico de bajo grado como nexo común entre dichas patologías ya que la fisiopatología de la obesidad y las enfermedades cardiovasculares están estrechamente relacionadas con el proceso inflamatorio⁶⁴. En la figura 1.1, se pueden ver las principales patologías asociadas al proceso inflamatorio crónico. Por ello, recientemente se ha denominado a este proceso de inflamación meta-inflamación, o inflamación metabólica ⁶⁵.



Figura 1.1- Patologías asociadas a inflamación crónica de bajo grado ⁶⁶.

La inflamación crónica, aunque supone para el organismo un proceso similar al producido por la inflamación aguda o clásica, presenta ciertas diferencias con respecto a esta, ya que el proceso inflamatorio crónico viene mediado fundamentalmente por un aumento de la infiltración de macrófagos y linfocitos T citotóxicos, en comparación con la inflamación aguda en la que predomina la migración de neutrófilos. A su vez, evidencias científicas coinciden en que no se genera lesión en el tejido infiltrado a diferencia de la inflamación aguda, lo que hace que no se produzcan alteraciones estructurales o pérdida en las funciones primarias de los tejidos ⁶⁷. Por otro lado, al igual que ocurre en la inflamación aguda, también se produce un

aumento de citoquinas con actividad inflamatoria como la proteína C reactiva (PCR), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y las interleuquinas (IL) 1 β y 6⁶⁸⁻⁷¹.

Los macrófagos se originan a partir de monocitos plasmáticos y constituyen el tipo celular predominante en la inflamación crónica. Estos forman parte del sistema fagocítico mononuclear y expresan en el adipocito proteínas transportadoras de ácidos grasos (FABP2) así como receptores activadores de la proliferación de peroxisomas γ (PPARG). A su vez, los macrófagos pueden actuar sobre los lípidos para transformarse en células espumosas ateroscleróticas⁷². Unido a estos procesos, cabe resaltar la existencia de una interacción entre los macrófagos y los linfocitos, ya que las primeras moléculas provocan la activación de los linfocitos y estos generan citoquinas inflamatorias, las cuales a su vez tienen la capacidad de activar macrófagos. De esta manera, una vez que se produce la infiltración de linfocitos, este tipo de inflamación puede llegar a convertirse en un proceso crónico⁷³.

Por otro lado, es en el tejido adiposo blanco o visceral, donde parece que se inician los mecanismos inflamatorios de bajo grado y por lo cual dicho tejido acaba convirtiéndose en un órgano con capacidad inflamatoria, liberador de citoquinas pro-inflamatorias. Se supone que el aumento en número y tamaño de los adipocitos, provoca una reestructuración y como consecuencia de esta, una falta de oxígeno y muerte de los adipocitos que se encuentran más alejados de los vasos sanguíneos. Este proceso genera un proceso inflamatorio para fagocitar dichos adipocitos. Por otro lado, con la hiperplasia e hipertrófica de los adipocitos, también se produce lipoperoxidación que consiste en la oxidación de moléculas lipídicas. Dicha oxidación provoca igualmente un proceso inflamatorio mediado por células inmunológicas⁶⁷.

Aunque en un principio la inflamación se supone consecuencia de la obesidad, se piensa que también un proceso inflamatorio puede desencadenar dicha patología. De la misma manera, la enfermedad coronaria está ligada también al proceso inflamatorio mediado por adipoquinas inflamatorias, que favorecen la disfunción endotelial así como el proceso aterosclerótico, estableciéndose así una asociación entre la obesidad y la enfermedad cardiovascular⁷⁴.

La acumulación de grasa visceral contribuye a alteraciones del perfil lipídico, debido a que acaba provocando una inadecuada homeostasis de la glucosa y la insulina. Debido a la resistencia de la insulina presentada en los adipocitos de la región visceral, se produce un aumento de la lipólisis con la consecuente liberación de ácidos grasos libres que a través de la porta llegan de forma masiva al hígado y promueven la síntesis de triglicéridos (TG) y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Estas proteínas de VLDL a su vez, aumentan los niveles de apolipoproteína B (ApoB)⁴⁷. Además, la grasa visceral contribuye a la síntesis del

inhibidor del plasminógeno tisular (PAI-1), el cual inhibe la fibrinólisis, lo que conduce a un aumento el riesgo de enfermedad cardiovascular debido a que se favorece el efecto de generación de trombos y por tanto se facilita el proceso de aterogénesis ⁷⁴.

Por otro lado, la alteración del tejido adiposo provocada por la obesidad, origina la producción de citoquinas denominadas adipoquinas por proceder de los adipocitos. Aunque algunas de estas citoquinas tienen un efecto protector, otras sin embargo afectan de forma negativa al organismo. Los adipocitos y los macrófagos se activan provocando cascadas de señalización que dan lugar a la activación de citoquinas pro-inflamatorias como la interleuquina 6 (IL-6) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), pero también a moléculas características de la fase aguda de inflamación como la proteína C reactiva (PCR). Según estudios, se ha observado una relación directa ente el IMC y los niveles de PCR, IL-6, moléculas de adhesión y PAI-1 ^{75,76}. Estas moléculas mediadoras de la inflamación, promueven la migración y adhesión celular de monocitos y linfocitos a la capa subendotelial. A su vez, este mecanismo provoca la inhibición de la acción de la insulina que está relacionada con la insulino-resistencia que se produce en la patología de la obesidad ⁷⁴.

Por tanto, la producción y acción de citoquinas (incluidas las adipoquinas y macrófagos) de forma constante, acaba llevando a la inflamación del tejido adiposo y a su vez, genera la producción de proteínas inflamatorias en el hígado de manera que se genera una inflamación crónica y sistémica ⁷⁴.

Sin embargo, aparte de la acción de las citoquinas, existen otros mecanismos vinculados a la inflamación provocados por la compleja fisiopatología de la obesidad. Entre ellos destaca el estrés intracelular, producido por las alteraciones metabólicas originadas por la enfermedad. Otro factor es el debido al aumento de la oxidación provocada por las especies reactivas de oxígeno como los radicales superóxido, generados por la metabolización a nivel mitocondrial debido mayor aporte de sustratos a las células, lo cual incrementa la producción de citoquinas generando la respuesta inflamatoria ⁷⁴.

En el caso de las enfermedades cardiovasculares, la inflamación supone un mecanismo clave en la patogénesis de las mismas. La inflamación mantenida se acaba haciendo crónica y afecta a los tejidos y órganos del sistema circulatorio. El proceso aterosclerótico incluye un proceso inflamatorio que acaba produciendo la ruptura de la placa de ateroma, de manera que la inflamación está vinculada de forma clara con la trombosis y la enfermedad cardiovascular ⁷⁴.

La inflamación que afecta a los vasos sanguíneos es mediada principalmente por monocitos y macrófagos, junto con la acumulación de colesterol de baja densidad (LDL). Estas moléculas generan un núcleo de inflamación sobre la placa de ateroma generando la disfunción endotelial. A su vez, las citoquinas tales como la interleuquina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) son inducidas alterando las características del endotelio vascular favoreciendo la adhesión y coagulación debido a la expresión de moléculas de adhesión como la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1) y la selectina E (SELE).

El proceso aterosclerótico evoluciona mediado en parte por la acción del interferón gamma (IFN- γ) que provoca la fibrosis del vaso sanguíneo. Por su parte, los macrófagos que almacenan lípidos, convertidos en células espumosas, producen enzimas como la collagenasa que provocan la destrucción de la pared vascular.

A pesar de que han aumentado el número de investigaciones sobre el estudio de la relación entre la inflamación crónica, las enfermedades cardiovasculares y obesidad, sin embargo, sigue existiendo una falta de respuesta sobre cuáles son los mecanismos moleculares por los que se originan y se hacen crónicos dichos procesos inflamatorios; o cómo se relacionan entre sí, asociando un compendio de afectaciones tales como la resistencia a la insulina y alteraciones en el perfil lipídico entre otras ⁶³.

1.2.2 METABOLISMO LIPÍDICO

La implicación que posee el buen o mal funcionamiento de las rutas implicadas en el metabolismo lipídico, se encuentra estrechamente relacionada con la fisiopatología de las principales enfermedades crónicas y, en buena parte este funcionamiento depende de los hábitos dietéticos del individuo a lo largo de su vida⁷⁷. Una alteración del metabolismo lipídico, debida a una alimentación inadecuada, o debido a una carga genética desfavorable, puede suponer el desequilibrio de múltiples mecanismos que acaban desembocando en una cascada de reacciones dirigidas a alteraciones crónicas⁶¹.

Los lípidos dietéticos o los generados por el propio organismo, dada su naturaleza insoluble, necesitan ser transportados por lipoproteínas, las cuales están constituidas por macromoléculas que transportan lípidos desde el intestino, el hígado y los tejidos. Las lipoproteínas están formadas por un núcleo hidrófobo y una cobertura hidrófila la cual está compuesta por colesterol no esterificado, fosfolípidos, así como unas proteínas específicas

denominadas apolipoproteínas⁷⁸. Estas apolipoproteínas aparte de cumplir una función estructural, intervienen en el metabolismo lipídico de manera que interaccionan con receptores celulares y actúan como activadores o inhibidores de enzimas.

El estudio de las apolipoproteínas B y E, que en su conjunto están presentes en todas las lipoproteínas como se puede ver en la tabla 1.2, resulta especialmente interesante de cara a mejorar el conocimiento sobre los procesos que afectan al desarrollo de enfermedades crónicas entre las que destacan las cardiovasculares.

Tabla 1.2- Contenido de lipoproteínas en las diferentes apolipoproteínas	
Lipoproteína	Apolipoproteínas
Quilomicrón	AI,AII,AIV,B-48,C,E
VLDL	B-100,C,E
IDL	B-100,C,E
LDL	B-100
HDL	AI,AII,AIV,C,D,E
VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad. IDL, lipoproteínas de densidad intermedia. LDL, lipoproteína de baja densidad. HDL, lipoproteína de alta densidad ⁷⁹ .	

La apolipoproteína B (apoB) que forma parte de las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y, por tanto, de las lipoproteínas de densidad intermedia (IDL) y de baja densidad (LDL), se denomina apoB-100. Esta molécula, en humanos es secretada únicamente en el hígado, ya que en el intestino se secreta la apoB-48. La expresión de ambas moléculas procede del mismo gen, denominado igual que la molécula que codifica, apolipoproteína B (APOB), aunque en el caso de la apoB-48, el ARN mensajero sufre una modificación postranscripcional en el intestino, lo que produce un codón de finalización en la posición 48 de la proteína⁸⁰. Debido a que las VLDL, IDL y LDL presentan en su estructura la apolipoproteína apoB, la determinación plasmática a nivel bioquímico de la misma, representa el número total de moléculas aterogénicas en sangre, a diferencia de la apolipoproteína A1 (apoA1) que se asocia a la lipoproteína de alta densidad (HDL). Por otro lado, las moléculas de LDL compuestas por apoB, tienden a oxidarse y esto provoca que se transformen en moléculas más densas y pequeñas, con una mayor capacidad aterogénica ⁸¹.

Otra apolipoproteína de gran interés es la apolipoproteína E (apoE), debido a que se ha relacionado con una amplia variedad de enfermedades crónicas como se puede ver en la figura 1.2, ya que interviene en la regulación del metabolismo del colesterol, de los ácidos grasos, incluso de la homeostasis de la glucosa.

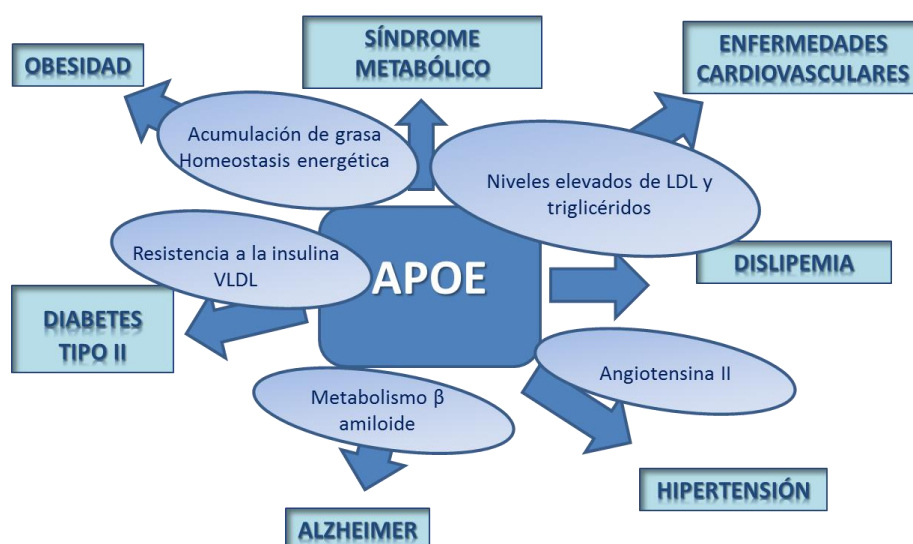


Figura 1.2– Asociación de la apolipoproteína E con enfermedades crónicas ⁸²⁻⁸⁷.

Adaptada de: *Genetic Association Database of NIH*, <http://geneticassociationdb.nih.gov>. Red elaborada mediante el software Cytoscape, <http://cytoscape.org>.

La apo E, se encuentra localizada en la estructura de los quilomicrones así como en las lipoproteínas VLDL, IDL y HDL. Resulta necesaria para que dichas moléculas cargadas de triglicéridos y colesterol, se eliminen del plasma sanguíneo. Esto sucede debido a que la apoE constituye el principal ligando del receptor de la lipoproteína LDL⁸⁸, aunque también se une a otros receptores afines.

El gen que codifica la apolipoproteína E, que se denomina APOE, se encuentra en el cromosoma 19 y presenta tres isoformas diferentes de la proteína, generadas por la sustitución de un solo aminoácido en las posiciones 112 y 158 ⁸⁹. La isoforma ApoE-ε3 es funcional y está presente en el 65 – 70 % de la población total. La isoforma ApoE-ε2 es disfuncional ya que está asociada con la hiper-lipoproteinemia tipo III, presentándose en el 5 - 10 % de la población. Por último está la isoforma ApoE-ε4, también disfuncional, que está presente en el 15 - 20 % de la población y está implicada en el proceso ateroesclerótico, así como en el Alzheimer y desarrollo cognitivo inadecuado ⁹⁰.

Además del transporte lipídico, es necesario que las enzimas relacionadas con la síntesis y degradación de lípidos, estén en un perfecto equilibrio metabólico. Para mantener el perfil lipídico en un nivel adecuado, este equilibrio depende en gran medida de una correcta síntesis y función de la lipoproteína lipasa (LPL), así como de la lipasa hepática C (LIPC) para la degradación de grasas e hidrólisis de lípidos. También depende de las fosfolipasas encargadas de la hidrólisis de fosfolípidos, así como de la liberación de ácidos grasos. A su vez, dependen

también de los transportadores ABC (del inglés *ATP Binding Cassette*; dominios de unión al ATP) implicados en el transporte celular del colesterol y regulación de fosfolípidos de membrana.

Dentro del metabolismo lipídico, cabe resaltar el metabolismo de los ácidos grasos poliinsaturados debido a su implicación con procesos inflamatorios y numerosos procesos patológicos entre los que destacan las afectaciones cardiovasculares ⁹¹, síndrome metabólico, obesidad, diabetes, incluso la enfermedad de Alzheimer ⁹². Estos ácidos grasos son precursores de los ácidos grasos de cadena larga: el ácido araquidónico y el ácido docohexanoico, precursores a su vez de los eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos), los cuales ejercen múltiples efectos sobre el organismo. A nivel cardiovascular, las prostaglandinas ejercen un efecto vasodilatador, sobre la presión arterial y el gasto cardíaco. Por otro lado, los eicosanoides también ejercen efectos sobre la adhesión de neutrófilos al endotelio vascular y sobre la agregación plaquetaria, donde las prostaglandinas, en concreto la prostaglandina I₂ (PGI₂) inhibe la agregación plaquetaria, mientras que el tromboxano A₂ (TXA₂) la estimula. Ejercen también efectos sobre el metabolismo ya que las prostaglandinas de la serie E, promueven una acción directa anti-lipolítica en el tejido adiposo ⁹³. A su vez, los eicosanoides envían señales intracelulares y participan en la transcripción genética y, actúan como ligandos de los receptores nucleares llamados receptores activados por proliferadores de los peroxisomas (PPAR) ⁹⁴. De esta manera, los ácidos grasos influyen sobre la regulación del metabolismo de los hidratos de carbono, de los lípidos, sobre el crecimiento y diferenciación celular, así como en la producción de citoquinas. Esto hace que, desde el punto de vista fisiopatológico, el metabolismo de los ácidos grasos poliinsaturados, esté ligado a procesos inflamatorios y antiinflamatorios, de respuesta inmune, así como otros procesos relacionados con estos ⁹³.

1.3 COMPUESTOS CON EFECTO RELEVANTE EN EL DESARROLLO DE ENFERMEDADES RELACIONADAS CON LA NUTRICIÓN

Dentro de la gran variedad de componentes que constituyen nuestra dieta, a día de hoy se sabe que algunos de ellos ejercen un efecto positivo sobre el tratamiento y prevención de enfermedades cardiovasculares y la obesidad. A continuación, se describen algunos de ellos.

1.3.1 ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3

Los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (n-3) están constituidos por más de un doble enlace, y se encuentran presentes principalmente en aceites de pescados. Estos ácidos grasos tienen carácter esencial, es decir, no se pueden sintetizar por el organismo y, por tanto, solo se pueden obtener a través de la dieta ⁹⁵.

El precursor de la familia de los ácidos grasos omega-3 es el ácido α -linolénico (18:3 n-3). Su estructura está compuesta por tres dobles enlaces, dónde el primero se localiza en el carbono número tres de la cadena. Este ácido graso posteriormente se metaboliza dando lugar al ácido eicosapentaenoico; EPA (20:5 n-3) y al ácido docosahexaenoico; DHA (22:6 n-3). De la misma forma, otros ácidos grasos poliinsaturados como los omega-6 (n-6), comparten vías metabólicas generando ácido araquidónico (20:4 n-6).

Una vez producidos el ácido eicosapentaenoico y el ácido docosahexaenoico, estos pueden ser utilizados como fuente de energía o bien, incorporarse a las membranas celulares y desencadenar la producción de eicosanoides, compuestos de carácter lipídico constituidos por 10 átomos de carbono, como las prostaglandinas (PG), prostaciclina (PC), tromboxanos (TX) y leucotrienos (LT), involucrados en la coagulación sanguínea, en la respuesta inmunológica y en procesos inflamatorios como se puede ver en la tabla 1.3. Las rutas metabólicas que generan eicosanoides a partir de los ácidos grasos n-6 y n-3 se denominan rutas de las ciclooxigenasas (COX) y la ruta de las lipooxigenasas (LOX), representadas en la figura 1.3.

Tabla 1.3- Compuestos producidos en las rutas metabólicas de las ciclooxigenasas y lipooxigenasas	
Vía de las ciclooxigenasas	Vía de las lipooxigenasas
<ul style="list-style-type: none">- Prostaglandinas- Tromboxanos- Prostaciclina	<ul style="list-style-type: none">- Leucotrienos- Lipoxinas
Están asociados con procesos circulatorios, digestivos, secretores, reproductores, circulatorios, entre otros.	Intervienen en las respuestas alérgicas, inflamatorias e inmunes, así como en la quimiotaxis (reacción de algunas células ante la concentración de determinados agentes químicos).
Fuente: ⁹⁶ .	

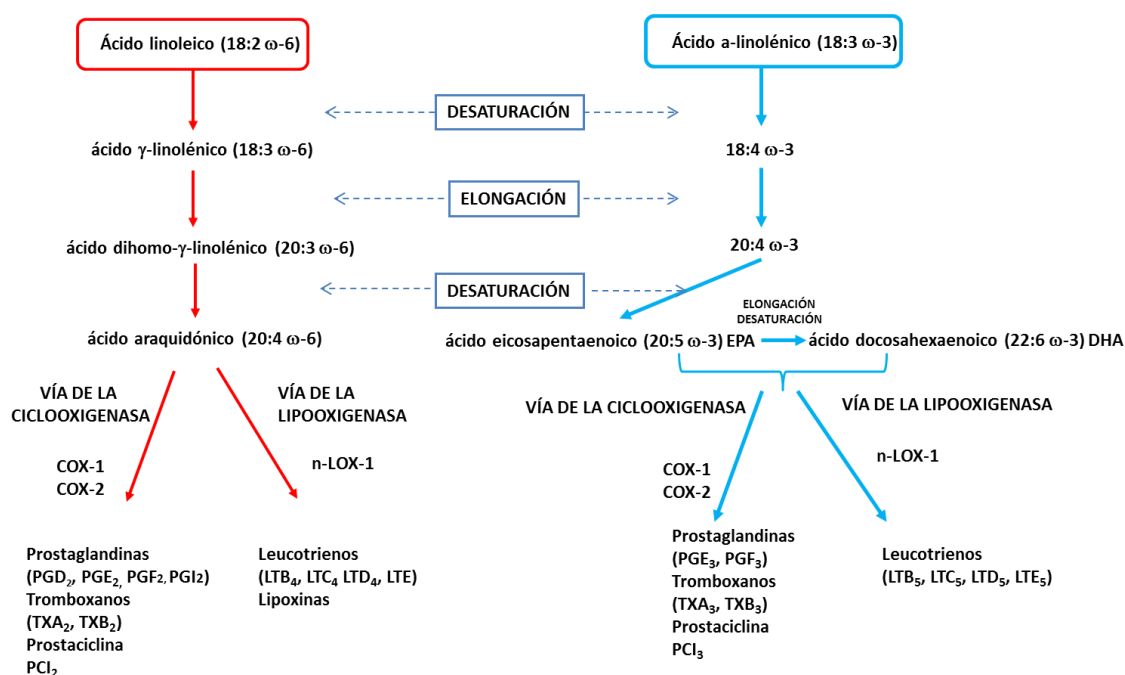


Figura 1.3- Rutas metabólicas de los ácidos grasos poliinsaturados ⁹³.

COX; ciclooxigenasa, LOX; lipooxigenasa, PG; prostaciclina, TX; tromboxanos, PC; prostaciclina, LT; leucotrienos.

En función del número y la posición en la que se localizan los dobles enlaces de los ácidos grasos, van a presentar diferentes propiedades. Sin embargo, los ácidos grasos n-6 y n-3 utilizan la misma ruta metabólica, de manera que compiten por las mismas enzimas: elongasas y desaturasas ⁹⁷. La enzima Δ5- desaturasa y la Δ6-desaturasa son las enzimas más relevantes en esta ruta metabólica. La enzima Δ6-desaturasa está regulada por hormonas como la insulina y tiene mayor afinidad por el ácido α-linolénico que por el ácido linoleico, además de ser la primera molécula, la que más se ingiere en la dieta habitual ^{98,99}. Por ello, un desequilibrio de consumo de ácidos grasos poliinsaturados puede generar la limitación del metabolismo de otros, por lo que es aconsejable establecer una proporción adecuada de ácidos grasos omega-6 y omega-3 en la dieta. En general, los eicosanoides producidos mediante la metabolización de los ácidos grasos n-3, son menos activos que los generados por los ácidos grasos n-6 ¹⁰⁰.

1.3.1.1 Fuentes dietéticas

Como se puede ver en las tablas 1.4 y 1.5, las principales fuentes de ácidos grasos omega-3 EPA y DHA en los alimentos se encuentran en los aceites de pescado, fundamentalmente de pescado azul como las sardinas, la caballa, el salmón, el atún o los boquerones. Dependiendo

de la especie, la época del año y el lugar de captura, variará el contenido de omega-3 en el pescado. Dicho contenido está relacionado con la cantidad de fitoplancton que ingiera el animal, ya que este es rico en estos ácidos grasos. Algunos aceites vegetales como el de colza, nuez y grosella negra, también tienen un elevado contenido en ácidos grasos omega-3, pero en este caso de ácido α -linolénico ⁹³.

Tabla 1.4- Contenido de ácidos grasos omega-3, en diferentes alimentos			
Alimento	Ácido α -linolénico (18:3 n-3) g en 100 g	EPA (20:5 n-3) g en 100 g	DHA (22:6 n-3) g en 100 g
Aceite de salmón	--	13.023	18.232
Aceite de hígado de bacalao	--	6.898	10.968
Aceite de sardina	--	10.137	10.656
Aceite de arenque	--	6.273	4.206
Caviar	--	2.741	3.8
Caballa en salazón	--	1.619	2.965
Salmón Atlántico de piscifactoría, cocido en seco	--	0.69	1.457
Anchoa europea enlatada en aceite escurrida	--	0.763	1.292
Arenque del Atlántico, en vinagre	--	0.843	0.546
Caballa del Atlántico, cocida en seco	--	0.504	0.699
Atún blanco, enlatado en agua	--	0.233	0.629
Peces planos (platija y lenguado), cocidos en seco	--	0.168	0.132
Fletán del Atlántico y el Pacífico, cocido en seco	--	0.08	0.155
Bacalao del Atlántico, cocido en seco	--	0.004	0.154
Mejillón azul, cocido al vapor	--	0.276	0.506
Ostras naturales, cocidas en seco	0.163	0.353	0.271
Almejas varias cocidas al vapor	--	0.138	0.146
--, dato no disponible.			
Base de Datos Nacional de Nutrientes para Referencias Estándar; versión 27 Software v.2.1.1. ¹⁰¹ .			

Tabla 1.5 - Contenido de ácidos grasos poliinsaturados de diferentes aceites culinarios				
Aceite	Ácido linoleico (18:2 n-6)	Ácido α -linolénico (18:3 n-3) g en 100g	EPA (20:5 n-3) g en 100g	DHA (22:6 n-3) g en 100g
Aceite de girasol	63.20	0.10	< 0.01	< 0.01
Aceite de maíz	57.67	1.03	< 0.01	< 0.01
Aceite soja	52.99	7.51	< 0.01	< 0.01
Aceite de colza	19.70	9.60	< 0.01	< 0.01
Aceite de oliva	7.68	0.72	< 0.01	< 0.01
Fuente: ⁹³ .				

Otra fuente de ácidos grasos poliinsaturados se encuentra en los diferentes alimentos funcionales enriquecidos en las proporciones más favorables en base a las necesidades de la población occidental.

1.3.1.2 *Beneficios*

Los ácidos grasos omega-3, y en concreto los ácidos grasos de cadena larga EPA y DHA, se han asociado a múltiples efectos beneficiosos para la salud entre los que destacan la disminución de riesgo cardiovascular, enfermedades inflamatorias e incluso algunos tipos de cáncer. A su vez, también se ha comprobado los efectos beneficiosos que poseen sobre determinados estados fisiológicos como es el caso del embarazo y la lactancia, para el adecuado crecimiento y desarrollo del bebé ⁹³.

A nivel cardiovascular, varios estudios revelan el efecto beneficioso del EPA y DHA ya que mejoran la salud cardiovascular al alterar el metabolismo lipídico, inducir cambios hemodinámicos, disminuir las arritmias, modular la función plaquetaria, mejorar la función endotelial e inhibir procesos inflamatorios ¹⁰².

La baja incidencia de enfermedades cardiovasculares en la población esquimal de Groenlandia, cuya dieta está basada en el consumo elevado de pescado, grasa de ballena y carne de foca, es rica en ácidos grasos omega-3, y esto ha dado pie a pensar que dichas moléculas son las causantes de este efecto ¹⁰³.

Numerosos estudios relacionan el consumo de los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 con la disminución significativa de algunos de los factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares relacionados con perfil lipídico, tales como disminución de colesterol total, colesterol LDL, triglicéridos y subida de colesterol HDL ^{104,105}.

En el caso de los triglicéridos, se ha visto que la ingesta de dosis de entre 3 a 4 g al día de EPA y DHA, provocan una reducción de triglicéridos en sangre entre el 25 y 35 %. Se supone que es debido a la reducción de la síntesis y secreción de VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad) y por el aclaramiento de estas lipoproteínas como consecuencia de la lipoproteína lipasa ⁹⁸.

Otro de los efectos beneficiosos que aporta el consumo de ácidos grasos n-3 y, más concretamente el EPA, es la inhibición de la agregación plaquetaria que a su vez inhibe la formación de tromboxanos TxA_2 ¹⁰⁶ al producirse la sustitución parcial de ácido araquidónico por ácidos grasos omega-3 en las membranas celulares de plaquetas. Otro mecanismo antitrombótico que se puede producir debido al aporte de ácidos grasos omega-3 (EPA y DHA) es debido a la modificación de la actividad de los receptores de los activadores plaquetarios, ya que estos ácidos grasos pueden actuar como antagonistas de los receptores TxA_2 . No obstante, los efectos antitrombóticos mostrados en diferentes estudios se producen tras la ingesta de una dosis elevada de ácidos grasos omega-3 ¹⁰⁷.

Además del efecto antitrombótico, también se ha observado un efecto antiarrítmico, el cual se puede explicar debido a que el aporte de EPA y DHA provoca la modificación de las corrientes iónicas, a nivel de los canales de sodio dependientes de voltaje en la membrana celular de los cardiomiocitos. Esto parece que mejora la estabilidad eléctrica en la contracción del miocito cardíaco ⁹⁸. Aparte de este mecanismo, el efecto también puede ser debido a la disminución de concentraciones en plasma y membranas celulares de ácidos grasos no esterificados ¹⁰⁷.

Por otro lado, también se ha determinado un efecto antiinflamatorio derivado de los ácidos grasos omega-3, en concreto del DHA. Aunque aún no se sabe con certeza cuál es el mecanismo implicado en el efecto antiinflamatorio provocado por los ácidos grasos omega-3, se piensa que puede ser debido a la reducción de la expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1 y SELE) que disminuiría la adhesión e infiltración de monocitos y macrófagos al endotelio vascular. Este fenómeno se ha correlacionado con una mayor estabilidad de la placa de ateroma, que a su vez se ve potenciado por la incorporación de ácidos grasos omega-3 a la misma aumentando la estabilidad. De forma paralela, la disminución de la interacción de monocitos con el endotelio, puede ser provocada por la disminución del factor activador de las plaquetas (PAF), molécula que contribuye a la adhesión al endotelio vascular ¹⁰⁶.

Otro mecanismo posible sobre el efecto antiinflamatorio podría ser la activación de los receptores activadores de la proliferación de peroxisomas gamma (PPARG), lo que provoca la inhibición de la producción de metaloproteasa-9 mejorando la estabilidad de la placa de ateroma ¹⁰⁶.

Puesto que niveles elevados de tensión arterial suponen un importante factor de riesgo cardiovascular, en cierta medida modificable por determinados patrones dietéticos, diferentes estudios han investigado si el consumo de ácidos grasos poliinsaturados afecta positivamente a los niveles de presión arterial. Los resultados han mostrado que niveles elevados de ingesta de omega-3 (≥ 3 g/día) provocan una disminución de la presión arterial, fundamentalmente la presión arterial sistólica, en personas mayores e hipertensas. Sin embargo, existe discrepancia entre estudios. Los posibles efectos biológicos asociados a la reducción de la presión arterial debido al consumo de omega-3, son variados: prevención de la fibrosis vascular, cambios en los canales iónicos que influyen sobre la frecuencia cardíaca, mayor síntesis de óxido nítrico endotelial, inhibición de la secreción de aldosterona y aumento de prostaglandinas con efecto antiplaquetario y vasoactivo ¹⁰⁸.

Según la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA)¹⁰⁹ se realizó un dictamen científico para evaluar las dosis de ingesta tolerables de ácidos grasos omega-3, en concreto de EPA, DHA y DPA, llegando a la conclusión de que los datos disponibles son insuficientes para establecer unos niveles de ingesta tolerables ingeridos de forma individual o combinados para cualquier grupo de población. Sin embargo, se ha visto que las ingestas de suplementos de EPA y DHA combinados a dosis de hasta 5 g/día, así como la ingesta de suplementos de EPA hasta 1.8 g/día, no plantean problemas de seguridad para adultos. Las recomendaciones dietéticas para EPA y DHA en base a las consideraciones de riesgo cardiovascular para los adultos europeos se establece entre 250 y 500 mg/día. En el caso de la ingesta de suplementos de DHA de hasta 1g/día no han planteado problemas de seguridad para la población en general. En el caso de la suplementación exclusiva de DPA no existen datos disponibles, ya que los estudios realizados en humanos con aceites de pescado que contiene DPA, la concentración es desconocida y relativamente baja, y además están combinados con EPA y DHA.

1.3.1.3 *Recomendaciones e ingestas*

A continuación, en la tabla 1.6 se muestran las recomendaciones marcadas por diferentes organismos, sobre la ingesta de ácidos grasos n-3 en los últimos años ^{109–113}:

Tabla 1.6- Recomendaciones de ingesta de ácidos grasos n-3 por autoridades internacionales		
Año	Recomendación	Organismo
1992	0.5 % VCT ácidos grasos n-3 No exceder de un 5 % VCT ácidos grasos n-3 Mujeres: 1 g/día ácidos grasos n-3 Hombres: 1.6 g/día ácidos grasos n-3	Comité Científico de la Alimentación Humana de la Comisión Europea (SCF)
2008	0.5 – 2 % VCT ácidos grasos n-3 (totales) 0.5 - 0.6 % VCT ácido α -linolénico Mujeres* y hombres: 0.250 g/día de EPA +DHA Mujeres embarazadas o en lactancia: 0.3 g/día de EPA+DHA Mujeres embarazadas o en lactancia al menos 0.2 g/día DHA	FAO/WHO <i>Expert Consultation</i>
2009	1 % VCT ácido graso n-3 α -linolénico 2-3g/día ácido graso n-3 α -linolénico 250 mg/día EPA +DHA.	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA)
2010	0.5 % VCT ácido α -linolénico. 250 mg/día EPA +DHA.	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA)
2012	250-500 mg/día EPA + DHA. 5 g/día EPA + DHA no plantea problemas de seguridad en adultos. 1.8 g/día EPA no plantea problemas de seguridad en adultos.	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA)
VCT; Valor Calórico Total. EPA, ácido eicosapentaenoico . DHA, ácido docosahexaenoico. * Mujeres no embarazadas y sin lactancia. Fuente: 109–113,		

Los datos recopilados sobre la ingesta de ácidos grasos poliinsaturados se basan principalmente en los cuestionarios de consumo de alimentos y suplementos. Se ha observado que los ratios entre el consumo de ácidos grasos n-6 y n-3 oscila entre los 15-20/1 en los países industrializados, mientras que en la prehistoria se ha estimado que se llegaron a consumir un ratio de 1/1 ¹¹⁴. La media de la ingesta de ácidos grasos n-3 totales entre el periodo comprendido entre los años 2000 al 2006 representa 1.49 g/día ¹¹⁵. Un estudio reciente sobre el consumo de ácidos grasos poliinsaturados realizado con 418 adultos comprendidos entre 18 y 60 años pertenecientes a 15 provincias españolas, realizado mediante cuestionarios de ingesta de alimentos durante 48 horas, presentó un ratio entre el consumo de ácidos grasos n-6 y n-3 de: 11/1.8 en dicha población española ¹¹⁶. Los consumos de ácidos grasos n-3 estimados en este estudio se muestran en la tabla 1.7. Según los resultados obtenidos en los estudios, la mayoría de la población no llega a cubrir las cantidades diarias recomendadas de este grupo de nutrientes.

Tabla 1.7 - Ingestas de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 en la población española		
Ácidos grasos	Consumo (g/día)	Porcentaje de la población que no cumple las recomendaciones (%)
Ácidos grasos n-3 totales	1.8 ± 0.60	84.70
Ácido α-linolénico	1.3 ± 0.32	45.00
EPA	0.16 ± 0.14	62.90
DHA	0.33 ± 0.21	
EPA, ácido eicosapentaenoico . DHA, ácido docosahexaenoico. Fuente: ¹¹⁶ .		

1.3.2 INHIBIDORES DE LA ALFA AMILASA

Los hidratos de carbono constituyen la principal fuente de energía de la dieta y son transformados a moléculas simples para poder ser posteriormente absorbidos en el intestino. El paso de moléculas complejas de hidratos de carbono a moléculas simples se lleva a cabo mediante la acción de dos principales enzimas: la amilasa y la glucosidasa.

La α-amilasa es una enzima dependiente de cloruro que hidroliza los hidratos de carbono complejos como el almidón, descomponiéndolos en dextrina. Esta enzima que actúa a un pH óptimo comprendido entre 6.7 y 7.2 es secretada principalmente por las glándulas salivales y por el páncreas en el intestino.

Gracias a la acción de estas enzimas, la glucosa y el resto de monosacáridos son transportados a través de la vena porta al hígado. Los monosacáridos que no se utilizan de inmediato para una función energética se almacenan en forma de glucógeno en el hígado, o en forma de grasa (triglicéridos) en el tejido adiposo, el hígado y el plasma. Los hidratos de carbono que son resistentes a la digestión en el intestino entran en el colon, donde son fermentados por las bacterias que allí se hospedan para producir ácidos grasos de cadena corta, dióxido de carbono y metano.

1.3.2.1 Fuentes dietéticas

La existencia de inhibidores naturales de la α-amilasa en algunas plantas leguminosas y cereales se conoce desde 1943, considerándose como sustancias anti-nutrientes. Estos inhibidores forman parte de los compuestos polifenólicos y glicoproteínas de las plantas. Los

inhibidores de la α -amilasa están también presentes en varias especies vegetales como el trigo, el arroz y las leguminosas. Uno de estos inhibidores es la faseolamina, cuyo nombre proviene de la leguminosa *Phaseolus vulgaris* perteneciente a la familia *Fabaceae*. El compuesto activo permite bloquear la acción de la α -amilasa pancreática provocando una menor hidrólisis de almidón y por tanto, menor absorción de monosacáridos en el intestino proximal ¹¹⁷.

Las especies de las judías comunes *Phaseolus spp.* poseen tres tipos de inhibidores de la enzima α -amilasa: alfa amilasa inhibidor 1 (α -AI1), alfa amilasa inhibidor 2 (α -AI2) y alfa amilasa como inhibidor (α -AIL). Estas glicoproteínas se unen a la α -amilasa de forma no covalente, principalmente a través de una interacción hidrofóbica, y esto provoca la inhibición de la digestión del almidón ¹¹⁸. La isoforma α -AI1 que es la más común de las isoformas y está presente en la mayoría de las especies de judías de todo el mundo, tiene actividad inhibitoria de la α -amilasa en humanos y fue descubierta en 1945 por *Bowman* ¹¹⁹. Los factores que afectan a la actividad del inhibidor de la α -AI1 isoforma son el pH (óptimo entre 4.5 y 5.5), la temperatura (óptima entre 22 y 37 °C), el tiempo de incubación que dependen del pH y la presencia de determinados iones. El inhibidor es completamente inactivado por ebullición durante 10 minutos ¹²⁰. La isoforma α -AI1 se encuentra únicamente en las semillas y se concentra en los cotiledones y en los ejes embrionarios (aquí puede llegar a haber, tres veces más concentración que en los cotiledones) de la semilla ¹²¹.

La isoforma α -AI1 se sintetiza en el retículo endoplasmático rugoso, posteriormente es modificada en el aparato de Golgi y luego transportada a vacuolas de almacenamiento. Las cantidades de esta isoforma aumentan hasta un máximo constante después de los 28 días, hasta su maduración, aunque esta cantidad disminuye durante el secado, por lo que este compuesto se obtiene mejor del producto del que no se ha eliminado el agua ¹²¹.

1.3.2.2 *Beneficios*

Desde 1980 se lleva investigando sobre el uso de los inhibidores de la enzima α -amilasa de las judías para el tratamiento de la obesidad y diabetes. Aunque trabajos han mostrado que estos compuestos no influyen sobre la digestión del almidón, posteriormente gracias a la mejora de los procesos de extracción, tales como extracción mediante dióxido de carbono supercrítico, así como el fraccionamiento y tratamiento por calor, han llevado a demostrar su eficacia en los seres humanos. Estudios preclínicos sobre los extractos de *Phaseolus vulgaris* muestran

efectos potenciales para su uso en el control de la ingesta, el peso corporal, la acumulación de lípidos y el control de la glucemia ¹²¹.

Estos efectos pueden estar mediados fundamentalmente por la inhibición de la α -amilasa que conduce a una menor digestión, absorción y metabolismo de los carbohidratos y por tanto, de su aporte calórico, favoreciendo por otro lado a una menor glucemia postprandial y menores niveles de insulina con la consecuente menor acumulación de grasa¹²².

Otro mecanismo que puede estar implicado resulta del bloqueo de la digestión del almidón, por el cual este llegaría a colon donde las bacterias allí residentes lo degradarían produciendo ácidos grasos de cadena corta, dióxido de carbono y metano, comportándose entonces como almidón resistente. Además, su efecto retrasaría el vaciamiento gástrico produciendo sensación de saciedad y traduciéndose en una menor ingesta de alimentos ¹²⁰.

Ya que la principal fuente de energía proviene de la ingesta de hidratos de carbono de la dieta, enfocar los tratamientos para reducir la absorción de estos compuestos puede suponer un mecanismo de intervención en el manejo de la obesidad y el control de la glucemia postprandial. Una de las alternativas es la inclusión en la dieta de productos que enlentecen la absorción de carbohidratos a través de la inhibición de las enzimas responsables de su digestión, como los inhibidores de la enzima α -amilasa.

Por ello, uno de los aspectos estudiados ha sido el efecto de los extractos de *Phaseolus vulgaris* (faseolaminas) sobre la reducción del peso corporal y la masa grasa. Analizando los ensayos clínicos realizados hasta la fecha con extractos de *Phaseolus vulgaris* a diferentes dosis, muestran un efecto modesto, aunque no despreciable sobre el peso corporal y la masa grasa. Sin embargo, son necesarios más estudios y de mayor duración para evaluar los efectos de los extractos.

Diferentes estudios clínicos abordan el efecto potencial de los extractos de *Phaseolus vulgaris* en la respuesta de glucemia postprandial. Estos parecen indicar que los extractos podrían reducir los picos post-prandiales de glucemia de una forma dosis dependiente. Por lo que se puede traducir en una reducción del índice glucémico del alimento ¹²³. El efecto sobre la reducción de la respuesta postprandial de extractos parcialmente purificados de alubias blancas ha sido evaluado en estudios *in vitro* ¹²⁴ y en humanos ^{125,126}. La mayoría de estos estudios demuestran una respuesta glucémica inferior con respecto al placebo, sin embargo, las reducciones han mostrado ser significativas en dosis mayores a 1500 mg/día, y son necesarios nuevos estudios correctamente diseñados para confirmar estos resultados.

Por otro lado, diferentes estudios han mostrado un efecto beneficioso de las faseolaminas sobre el perfil de lípidos, tanto en la reducción de triglicéridos como aumento de HDL ^{120,127}. Esto podría resultar de gran interés en la reducción del riesgo asociado a sobrepeso y obesidad.

Otro efecto también estudiado es el de la saciedad. Investigaciones con extractos o derivados de *Phaseolus vulgaris* han mostrado reducciones sustanciales en el apetito en ratas expuestas a múltiples procedimientos experimentales. Los extractos de *Phaseolus vulgaris* fueron particularmente eficaces en la reducción de la ingesta de los alimentos y bebidas altamente palatables ^{128,129,129,130}. En un estudio reciente, la administración de extractos purificados de *Phaseolus vulgaris* tras las 2 horas de la ingesta redujo los niveles de grelina plasmática de forma similar al placebo, pero no se observó un rebote de sus niveles tras ese tiempo que sí fue observado con placebo ($p = 0.04$). La sensación de saciedad se redujo de forma significativa con placebo tras las 3 horas, pero no con los extractos que además mostraron un significativo menor deseo de comer que el placebo ($p = 0.02$) a lo largo de las 3 horas. Según el autor esto demostraría su potencial efecto sobre la saciedad y su interés en el manejo de la obesidad, así como de la intolerancia a la glucosa y la diabetes ¹³¹.

Estudios preclínicos de seguridad con faseolaminas (*Phase 2®*) indican un índice de toxicidad (NOAEL del inglés: *no observed adverse effect level*) en roedores expuestos a dosis de 2.5 g/kg/día en 28 días ¹²⁰ o 1.112 g/kg/día en 90 días ¹³². Estas dosis apoyan una ingesta oral en humanos de hasta 6 g de *Phase 2®*/día (85.7 mg/kg/día asumiendo una persona de 70 kg) mediante la aplicación de un factor de seguridad de 30 ^{133,134}. Las dosis máximas dadas a las ratas en este estudio serían equivalentes a aportar a aportar 175 g/día en un sujeto de 70 Kg ^{133,135}. Estudios clínicos de evaluación de eficacia indican la ausencia de efectos adversos sobre la salud en humanos ingiriendo dosis hasta 3 g/día en dosis repartidas con las comidas por períodos entre 30 días y 24 semanas ¹³⁵.

1.3.2.3 Recomendaciones e ingestas

Las dosis diarias de inhibidores de α -amilasas empleadas para la reducción de peso en mujeres obesas, se encuentran entre 500 mg y 1000 mg por cada 100g de hidratos de carbono consumidos ¹¹⁷.

Un panel de seguridad privado, ha establecido la dosis diaria ingerida en un máximo de 10 gramos ¹²⁰.

Según estudios en humanos, la eficacia de extracto proteico que contiene la isoforma 1 del inhibidor de α -amilasa sobre la ingestión de almidón se mostró en 1991 en 3.3 mg (junto con una solución con almidón de arroz y glucosa), lo que produjo un aumento de la movilidad gastrointestinal, de las secreciones pancreáticas y biliares; 1500 mg antes de cada alimento, lo que ocasionó una pérdida de peso corporal (masa grasa) sin efectos adversos, y 1500 mg dos veces al día, lo que generó una pérdida de peso y disminución de triglicéridos en plasma ¹²².

1.3.3 FIBRA Y FRUCTOOLIGOSÁCARIDOS

La fibra dietética constituye un conjunto heterogéneo de sustancias que se encuentra clasificado dentro del grupo de los hidratos de carbono. Una de las definiciones creadas en 1998 por la Organización de las Naciones Unidas para la agricultura (FAO) junto con la Organización Mundial de la Salud (OMS), clasifica la fibra alimentaria como “las paredes celulares vegetales presentes en la dieta” ¹³⁶. En el año 2001 la *American Association of Cereal Chemist* definió la fibra alimentaria como la parte comestible de las plantas e hidratos de carbono análogos, que son resistentes a la digestión y absorción en el intestino delgado humano con fermentación parcial o total en el colon ¹³⁷. En esta definición se incluyen: polisacáridos, oligosacáridos, lignina y sustancias vegetales asociadas. Una de las definiciones más aceptadas que existe por tanto de la fibra dietética, es la que considera los hidratos de carbono no digeribles y la lignina.

La fibra dietética se puede clasificar en función de si es fermentable o no en el colon. De esta manera se encuentra:

- La fibra insoluble que es muy poco fermentable y en la que predominan compuestos como la celulosa, algunas hemicelulosas y diferentes polifenoles como la lignina. Este tipo de fibra tiene un papel destacado en la digestión de manera que acelera el tiempo de tránsito intestinal y aumenta el volumen de las heces, posee un efecto laxante evitando el estreñimiento y otras alteraciones asociadas.
- La fibra soluble, por el contrario, es fermentable casi completamente en el colon por la acción de la flora bacteriana y engloba a las pectinas, gomas, mucílagos, β -glucanos, entre otros. Este tipo de fibra forma geles en presencia de agua. Los productos de la

fermentación tienen efectos sobre la funcionalidad intestinal, el metabolismo lipídico (mediante la regulación de la colesterolemia), sobre el metabolismo glucémico (mediante la atenuación de la respuesta glucémica) y el mantenimiento de una adecuada flora intestinal.

1.3.3.1 Fuentes dietéticas

La mayoría de la fibra alimentaria se encuentra en los alimentos de origen vegetal, como hortalizas, frutas, frutos secos y cereales. Sin embargo, la fibra dietética se puede encontrar también en alimentos de origen animal, así como en aditivos (espesantes y gelificantes entre otros) y otros ingredientes alimentarios.

Las principales fuentes de fibra dietética se localizan en las paredes celulares de los vegetales. Entre los principales compuestos encontramos la celulosa, la hemicelulosa, la lignina, así como pectinas, gomas y mucilagos. La celulosa se encuentra principalmente en las cascarrillas de los granos de cereal, así como en las legumbres y en menor medida en verduras y hortalizas como las acelgas, col, zanahoria y lechuga. En el caso de los cereales, la cantidad de fibra dependerá mucho de la forma de extracción y refinado del cereal. La mayor parte de fibra que se pierde al aumentar la tasa de extracción es de tipo insoluble. En la tabla 1.8, se encuentran representados los diferentes componentes de la fibra dietética.

Tabla 1.8- Componentes de la fibra dietética		
Fibra		Sustancias análogas a la fibra
Polisacáridos no amiláceos	Lignina y otras sustancias asociadas	
<ul style="list-style-type: none"> • Celulosa • Hemicelulosas • Pectinas • Gomas • Mucilagos 	<ul style="list-style-type: none"> • Ligninas • Ceras • Fitatos • Cutinas 	<ul style="list-style-type: none"> • Inulina • Amiloides resistentes • Fruto-oligosacáridos • Azúcares no digeribles
Fuente: ¹³⁸ .		

1.3.3.2 Beneficios

Dentro de los componentes de la fibra destacan los fructo-oligosacáridos (FOS) por sus propiedades beneficiosas para la salud. Los fructo-oligosacáridos están constituidos por polímeros de entre diez y veinte moléculas de fructosa, poseen un grado de polimerización

inferior a 10, y son fermentados a nivel de colon produciendo ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Estos, parecen estar relacionados con la disminución de los niveles de colesterol sérico y triglicéridos. Además, los fructo-oligosacáridos de cadena corta (formados por un máximo de cinco moléculas de monosacáridos) parecen mejorar la absorción de ciertos minerales así como estimular el crecimiento de bacterias saludables (bifidobacterias y lactobacilos) y disminuir el crecimiento de bacterias patógenas; por estas razones, se les atribuyen propiedades prebióticas ¹³⁹. Además, los fructo-oligosacáridos aportan un sabor dulzón característico lo que permite ser utilizado como agente edulcorante.

Respecto a las dosis de fructo-oligosacáridos, la seguridad para su uso como ingrediente ha sido evaluada por las autoridades sanitarias de diversos países europeos y por Estados Unidos. Como resultado, el uso de FOS como ingrediente se encuentra ampliamente aceptado sin ningún tipo de restricción en numerosas formulaciones alimentarias ¹⁴⁰. Desde 1992, según la *Food and Drug Administration* (FDA) de Estados Unidos, los fructo-oligosacáridos son clasificados como “generalmente reconocidos como seguros” (GRAS, por sus siglas en inglés) ¹⁴¹. Se han realizado diversos estudios de toxicidad aguda, crónica, carcinogenicidad y genotoxicidad en animales de experimentación, los cuales han demostrado que los FOS, incluso a dosis altas, no tienen consecuencias en la mortalidad, la morbilidad, la toxicidad (sobre órganos diana, a nivel de desarrollo o reproducción) ni la carcinogenicidad ¹⁴⁰. Igualmente, los estudios clínicos realizados con inulina y/o FOS, tanto en sujetos normales como en pacientes, coinciden en la seguridad de estos compuestos ¹⁴⁰. Dado el efecto inocuo de estos compuestos, no se ha establecido una dosis diaria aceptada (IDA) para este tipo de sustancias ¹⁴⁰.

Este tipo de compuestos pueden proceder de vegetales o ser de origen microbiano. Las principales fuentes de origen vegetal proceden de la achicoria, de la caña de azúcar, así como de otros vegetales. La síntesis enzimática se hace a partir de sacarosa y está formada por enlaces de tipo β (2-1) con un grado de polimerización comprendido entre 3 y 5.

En general, los efectos beneficiosos de la fibra dietética están asociados a la fermentación mediante bacterias del tracto intestinal, a la motilidad y velocidad de tránsito intestinal, así como a la modificación de la absorción y metabolismo de determinados componentes de la dieta. Entre los mecanismos que producen los efectos beneficiosos se encuentran: la producción de ácidos grasos de cadena corta como ácido acético, propiónico, butírico y butirato que mejoran el estado del mucosa intestinal; la reducción de la absorción de glucosa y

colesterol; el aumento de la velocidad del tránsito intestinal y del volumen fecal, así como una mayor rapidez de eliminación de compuestos tóxicos.

El aporte de fibra puede generar por tanto un efecto beneficioso para determinadas patologías como el estreñimiento y la diarrea donde, en este último caso, parece que mejora la absorción de sodio y agua por el colon ayudando a restablecer el equilibrio osmótico. En el caso del síndrome de intestino irritable que cursa con estreñimiento, ayuda a disminuir la presión en el colon y también a reducir el dolor abdominal. En el caso de la diverticulosis, el consumo de fibra parece ayudar a disminuir la presión intraluminal en el colon, evitando así la formación de divertículos a la vez que mejora la función del intestino grueso. En el caso del síndrome de intestino corto, ayuda a controlar la diarrea osmótica estimulando la reabsorción de agua. A su vez, también puede influir en la prevención del cáncer de colon, estimándose que la fibra tiene un efecto protector frente a esta patología debido a que disminuye el tiempo de tránsito intestinal, acorta el tiempo de eliminación de sustancias potencialmente cancerígenas, facilita la excreción de ácidos biliares y disminuye el pH intestinal.

Por otro lado, el consumo de fibra también puede ayudar al manejo de la diabetes, de la obesidad, así como sobre el perfil lipídico. La utilidad del consumo de fibra alimentaria sobre el tratamiento de la diabetes tipo II, se ha demostrado tanto a nivel de glucemia postprandial así como sobre la sensibilidad de la insulina. Los mecanismos de acción propuestos para explicar dichos efectos son principalmente tres. Por un lado, se explica debido a que la fibra alimentaria retrasa el vaciado gástrico y por tanto se regula la glucemia postprandial. Por otro lado, se explica debido a la producción de ácidos grasos de cadena corta como consecuencia de la fermentación de la fibra. Entre los ácidos grasos producidos, destaca el propionato ya que está relacionado con la gluconeogénesis en el hígado, que contribuye a la reducción de insulina. A su vez, también se explica debido a que parece que reduce la resistencia periférica de la insulina ¹³⁸.

En el caso de la obesidad, la ingesta de fibra resulta beneficiosa debido a tres factores: por un lado, el consumo elevado de fibra ayuda a generar mayor sensación de saciedad y aportar una densidad calórica menor. Por otro lado, se ha estudiado que el consumo de fibra aumenta la sensibilidad periférica a la insulina favoreciendo la movilización de lípidos. Y por último, el consumo de fibra se asocia al consumo de alimentos que contienen fibra como las frutas, verduras y hortalizas, los cuales tienen también un reducido contenido calórico. De hecho, diferentes investigaciones de tipo observacional, han encontrado que las poblaciones con altas ingestas de fibra presentan una menor prevalencia de obesidad ^{142,143}.

Las fibras solubles presentan la capacidad de formar mezclas viscosas en el tracto gastrointestinal que parecen estar implicadas en la mediación de la respuesta postprandial a la glucosa, así como en el retraso del vaciamiento gástrico. Esta acción podría también inducir potencialmente la sensación de llenado y la saciedad ¹⁴². Por otro lado, la fermentación intestinal que se produce con la ingesta de fibras solubles, también podría jugar un papel importante en la modulación de la saciedad ¹⁴⁴, sin embargo, los mecanismos asociados a esta acción no están del todo explicados.

Por otro lado, estudios revelan que los niveles de colesterol LDL en sangre pueden reducirse en un 5 % tras un consumo de fibra comprendido entre 5 y 10 gramos. El mecanismo de acción que explica este fenómeno se centra en la reducción de la absorción de colesterol a través del intestino debido al efecto quelante que posee la fibra sobre los ácidos biliares, así como a los debidos a la fermentación de la fibra que influye en las rutas metabólicas de síntesis de colesterol ¹⁴⁵.

1.3.3.3 *Recomendaciones e ingestas*

Las recomendaciones sobre el consumo de fibra para mantener una buena salud cardiovascular son las siguientes: en adultos (por encima de 18 años) se recomienda una ingesta de unos 25 - 35 g/día, con una proporción entre fibra insoluble y soluble de 3:1 ^{146,147}.

Según el estudio ENIDE (Encuesta Nacional de Ingesta Dietética) llevado a cabo por la Agencia Española de Seguridad Alimentaria (AESAN) realizado durante los años 2009 y 2010, la ingesta diaria de fibra en función del género y edad obtenida mediante registro de 3 días, resultó de media para hombres de 20.4 g de fibra total, y en el caso de las mujeres de 18.85 g ^{147,148}.

1.3.4 ESTEROLES VEGETALES

Los esteroides vegetales o fitoesteroides pertenecen a la familia de los triterpenos y poseen una estructura y función similar a la del colesterol, aunque incluyen un grupo metilo o etilo en el carbono 24. Se piensa que este tipo de moléculas tiene una función estructural de las membranas en los vegetales y que actúan como intermediarios del metabolismo vegetal ¹⁴⁹.

Existen más de 200 tipos de esteroides vegetales diferentes. Se pueden clasificar en dos grupos: los esteroides, que se caracterizan por presentar un doble enlace en la posición 5, y los estanoles que no tienen en su estructura dicho doble enlace, aunque estos son menos abundantes que los esteroides. Los esteroides vegetales más abundantes son el sitosterol o β -sitosterol, seguido por el campesterol y el estigmasterol ¹⁵⁰.

1.3.4.1 *Fuentes dietéticas*

El ser humano no sintetiza los esteroides vegetales sino el colesterol, por lo que la alimentación es la única fuente de este tipo de compuestos.

En general, casi todos los vegetales de la dieta contienen esteroides vegetales. Entre las fuentes dietéticas que contienen mayor cantidad de esteroides vegetales se encuentran el maíz, el girasol y la soja. Otras fuentes dietéticas de esteroides vegetales son las legumbres, frutos secos, cereales y otros vegetales ¹⁵⁰.

1.3.4.2 *Beneficios*

Existe una amplia variedad de evidencias científicas que han demostrado la capacidad que tienen los esteroides vegetales de inhibir la absorción de colesterol y por tanto de disminuir las concentraciones de colesterol total y colesterol LDL, reduciendo así el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares.

Los mecanismos propuestos que generan este efecto beneficioso se refieren a cómo afectan a la absorción intestinal de colesterol, a su síntesis, así como a los sistemas de eliminación. El efecto más y mejor estudiado de los esteroides vegetales es la inhibición de la absorción intestinal de colesterol, tanto el procedente de la alimentación (que supone de la dieta en torno a 300 mg/día), como el colesterol endógeno circulante en la bilis (en torno a 1000 mg/día generados) que al ser reabsorbido en el intestino constituye la principal forma de captación ¹⁵¹.

Los esteroides vegetales se absorben en el intestino en menor cantidad que el colesterol, debido posiblemente a que la enzima acil-coenzima-A colesterol acil-transferasa (ACAT) posee menor afinidad por los esteroides vegetales que por el colesterol, de manera que son menos

esterificados, incorporándose en menor cantidad a los quilomicrones. Otro posible mecanismo por el cual los esteroides vegetales se absorben en menor proporción puede ser debido al funcionamiento de los transportadores intestinales ABC que se encargan de eliminar el colesterol y sitosterol evitando su absorción y acumulación. Se ha estudiado que mezclas de micelas enriquecidas con sitostanol, son fuertes inductores de la expresión del transportador ABCA1 en células caco-2, como modelo similar al metabolismo intestinal humano ¹⁵².

Los esteroides vegetales, al ser más hidrofóbicos que el colesterol, pueden competir con él y desplazarlo de las micelas de absorción. Tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* se ha demostrado que de esta manera se produce una disminución de la incorporación del colesterol en las micelas y, por tanto, tiene lugar una disminución de la absorción intestinal de colesterol ¹⁵³.

Una menor absorción de colesterol provoca un aumento de síntesis endógena de colesterol y un aumento de la síntesis del receptor de las lipoproteínas de baja densidad, lo que produce una mayor eliminación de las lipoproteínas LDL y las IDL de la circulación.

Los esteroides vegetales o fitosteroides se utilizan en combinaciones apropiadas para el enriquecimiento funcional de alimentos por sus efectos sobre el metabolismo del colesterol, pudiendo ser una herramienta adicional en el tratamiento de las personas con hipercolesterolemia ¹⁵⁰.

Se ha declarado que una ingesta de entre 1.5 - 3.0 g/día de esteroides vegetales conduce a un efecto de disminución del colesterol-LDL de 7 – 12 % tras dos semanas de ingesta según la Autoridad Europea para la Seguridad de los Alimentos (EFSA) ¹⁵⁴. Según un meta-análisis realizado en 2014, el consumo de 3 g/día de esteroides y estanoles vegetales, provoca una bajada del 12 % de los niveles de LDL colesterol ¹⁵⁵.

En los diferentes estudios realizados, no se han observado efectos secundarios o reacciones adversas para este tipo de componentes ¹⁵⁶.

Aparte de los efectos beneficiosos de los esteroides vegetales sobre el metabolismo lipídico, también se han estudiado posibles efectos positivos sobre determinados cánceres como próstata, colon y mama, y procesos inflamatorios en enfermedades autoinmunes. Los mecanismos antitumorales se basan en los cambios producidos en la estructura y función de la membrana de las células tumorales, así como sobre las vías de transducción de señales encargadas del crecimiento tumoral y apoptosis ¹⁵⁰.

Por otro lado, algunos estudios sugieren un efecto beneficioso sobre la respuesta inflamatoria y sobre el sistema inmune, aunque aún es preciso realizar más investigaciones al respecto ¹⁵⁰.

1.3.4.3 Recomendaciones e ingestas

Aunque no existe una dosis diaria recomendada de esteroides vegetales, se ha establecido la referencia de 3 g/diarios como umbral prudente de los mismos ¹⁵⁰.

Según la bibliografía, dosis excesivas de esteroides vegetales pueden provocar disminución de carotenoides plasmáticos, sin embargo, no se han establecido ingestas diarias máximas tolerables ya que no hay suficientes estudios en humanos tratados con dosis por encima de los 6-9 g diarios ingeridos de forma regular y durante un tiempo ¹⁵⁰.

Se ha observado en estudios que un consumo diario de entre 1 a 3 gramos de esteroides vegetales reducen los niveles de colesterol ¹⁵⁰.

En los países occidentales el consumo de esteroides vegetales se sitúa en torno a los 150 a 400 mg/día ¹⁵⁷.

1.4 INFLUENCIA DEL GENOMA HUMANO SOBRE LA SALUD Y LA RESPUESTA A COMPONENTES DE LA DIETA

1.4.1 EL GENOMA HUMANO

El genoma del ser humano en su versión haploide está compuesto por alrededor de 3200 millones de pares de bases (3200 Mb) las cuales forman alrededor de 20000 - 25000 genes distribuidos en 23 cromosomas ¹⁵⁸. Sin embargo, tan solo un 30 % del ácido desoxirribonucleico (ADN) que forma el genoma, presenta regiones que forman genes, donde se encuentran regiones codificantes, no codificantes o reguladoras. Por tanto, el 70 % del ADN humano no constituye genes y por tanto no codifica proteínas.

A su vez, del 30 % del componente genético que forman los genes, solamente el 5 % constituye las regiones codificantes, de manera que el otro 25 % corresponde a regiones no codificantes

del genoma. Por lo que, en total, entre el 1.5 y 2 % del ADN total de un ser humano es codificante ^{159,160}.

Aunque el genoma humano tiene una distribución de nucleótidos y genes muy heterogénea a lo largo de su estructura, se ha podido comprobar que aproximadamente el 99.9 % es idéntico en todos los individuos. El 0.1 % restante, sin embargo, presenta millones de variaciones genéticas lo que ocasiona una gran diversidad de diferencias entre individuos, aportando así una gran significación biológica ¹⁶¹.

A estas variaciones genéticas también se las conoce como polimorfismos genéticos. Un polimorfismo genético se define como una variación genética que tiene lugar en individuos de la misma especie generando más de un alelo (forma alternativa de un gen) en un *locus* (localización de un gen en el genoma). Además, su frecuencia tiene que ser superior al 1 % en la población general ¹⁶².

Las variaciones genéticas entre individuos aportan la adaptación al entorno y permite la evolución de las especies en función de las condiciones de vida. La mayoría de los polimorfismos están localizados en regiones no codificantes de proteínas, sin embargo también se encuentran en regiones promotoras o reguladoras, así como en regiones codificantes que pueden repercutir sobre el fenotipo de las personas para distinguirlas unas de otras o para expresar determinadas patologías ¹⁵⁹.

La variabilidad genética puede utilizarse para determinar marcadores genéticos, aunque no todos los polimorfismos sirven como marcadores. Los marcadores genéticos deben reunir determinadas características tales como tener un coste económico y facilidad de identificación, tener la capacidad de transmitirse de unas generaciones a otras, o ser reproducibles e independientes bajo diferentes condiciones físicas y ambientales.

1.4.1.1 *Polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs)*

Uno de los marcadores genéticos más utilizados para el estudio de asociación gen-dieta, son los polimorfismos de un solo nucleótido. Estas variantes están constituidas, como su propio nombre indica, por variaciones puntuales a lo largo de la secuencia del genoma. Los polimorfismos de un solo nucleótido, o de nucleótido simple “SNPs” (por sus siglas en inglés: *Single Nucleotide Polymorphism*, pronunciado “snip”), son variaciones genéticas producidas por sustituciones de un solo nucleótido en la secuencia del genoma.

El empleo de SNPs como marcadores genéticos permite la asociación entre genes implicados en enfermedades multifactoriales como son la obesidad y enfermedades cardiovasculares, ya que al ser multigénicas, cada gen contribuye de forma limitada a la enfermedad y por tanto, son más difíciles de detectar mediante otros métodos de ligamiento paramétrico ¹⁶³.

Este tipo de variaciones genéticas se presentan en el genoma entre cada 100 a 300 pares de bases de promedio, estimándose que el total del ADN humano contiene en torno a los diez millones de polimorfismos de un solo nucleótido ¹⁶⁴. Los cambios más frecuentes se producen o bien entre purinas (“A” o “G”) o bien entre pirimidinas (“C” o “T”). Estos cambios suponen aproximadamente dos tercios del total de este tipo de variaciones, sin embargo, también se puede producir un cambio entre una pirimidina y una purina ^{165,166}.

Los cambios de base se pueden producir en las diferentes regiones del genoma, ya sean en regiones no codificantes localizadas en intrones (secuencias de nucleótidos eliminadas en el proceso de corte y empalme del ácido ribonucleico o ARN) o, por el contrario, en regiones codificantes o reguladoras, lo que afectará en mayor o menor grado a la funcionalidad del material genético. Estas últimas son menos frecuentes que las que se producen en regiones no codificantes.

Si los cambios se producen en regiones codificantes puede que la alteración no produzca ningún cambio de proteína, considerándose “sinónimos”. Por el contrario pueden producir cambios en la expresión de aminoácidos considerándose en este caso “no sinónimos”, menos frecuentes que las anteriores ¹⁶⁷.

A continuación, se representan los diferentes tipos de SNPs en función de la localización en el genoma:

- Localizados en regiones no codificantes.
- Localizados en regiones codificantes:
 - ✓ Sinónimos: En este caso la sustitución del nucleótido no genera un cambio de aminoácido en la proteína producida. También se denominan mutaciones silenciosas.
 - ✓ No sinónimos: En este caso la sustitución del nucleótido sí que genera un cambio en el aminoácido de la proteína que produce.
 - *Missense*: se produce un cambio de codón que provoca un cambio de proteína.

- **Nonsense:** se produce un cambio de aminoácido dando lugar a un codón de parada.

Estas variantes genéticas generan combinaciones alélicas con una sustitución de base lo que facilita el análisis de la incidencia en la población. La frecuencia alélica determina la cantidad de sujetos de la población que presenta cada alelo. En el caso del ser humano, los cromosomas autosómicos (no sexuales) están formados por dos alelos, uno perteneciente a la madre y otro al padre.

Una de las bases de datos más utilizada para conocer las frecuencias alélicas de varias poblaciones es *International HapMap Project* (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>). En la figura 1.4 se ha mostrado un ejemplo de frecuencias alélicas para un polimorfismo perteneciente al gen AGT (que codifica la pre-proteína del angiotensinógeno).

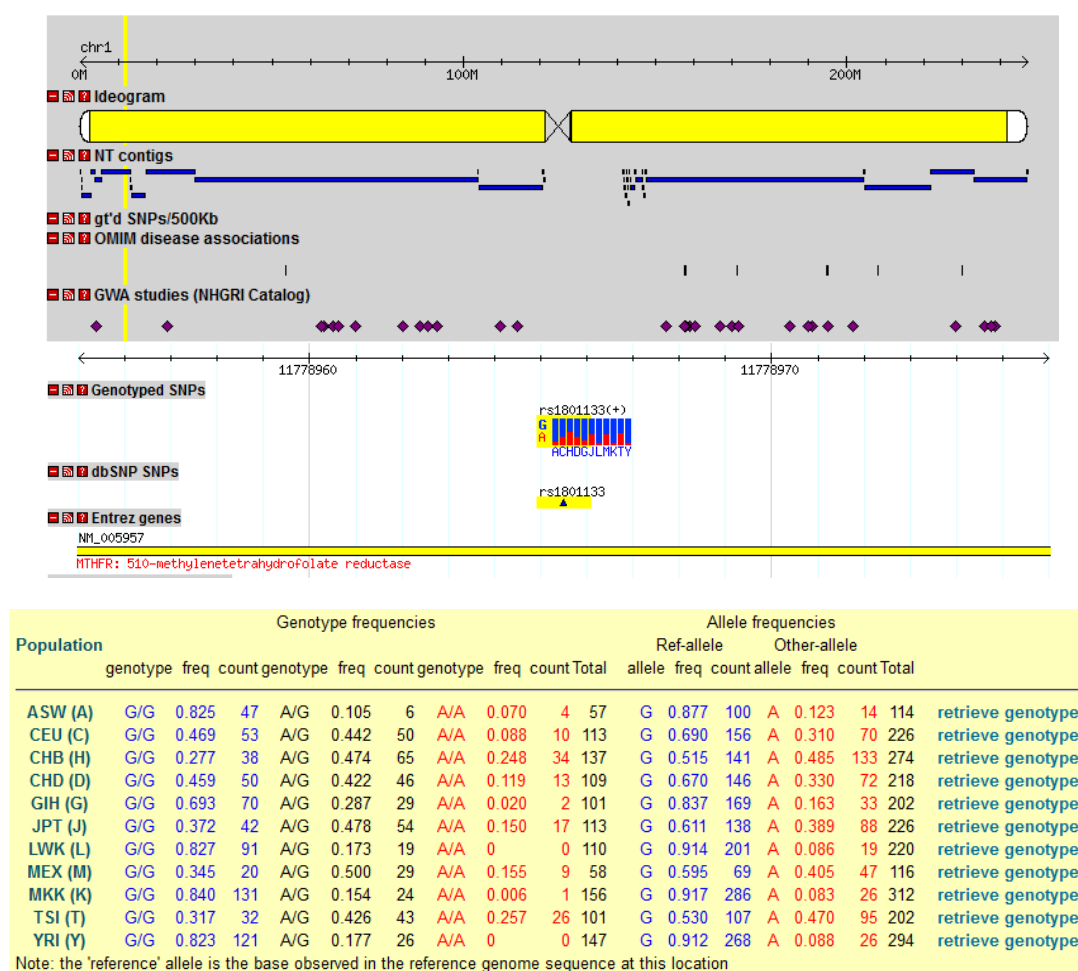


Figura 1.4- Frecuencias del polimorfismo perteneciente al gen AGT (Pre-proteína de angiotensinógeno)¹⁶⁸.

ASW (A): residentes del sureste de EE.UU. de ancestros africanos; CEU (C): Residentes en Utah de ancestros del norte y este de Europa; CHB (H): Chinos Han de Beijing, China; CHD (D): Chinos del área metropolitana de Denver, Colorado; GIH (G): Indios Gujarati residentes en Houston, Texas; JPT (J): Japoneses de Tokio, Japón; LWK (L): Luhya de Webuye, Kenia; MEX (M): Residentes en Los Ángeles, California, con ancestros mejicanos; MKK (K): Maasai de

Lo más frecuente es que cuanto más común es la frecuencia alélica, menor es el efecto genético aportado como se puede apreciar en la figura 1.5.

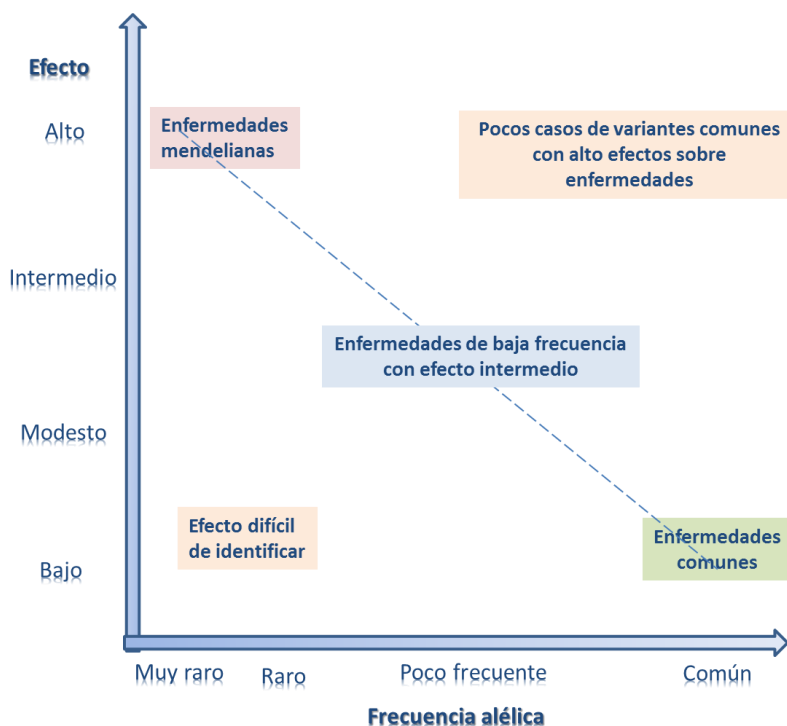


Figura 1.5- Viabilidad de la identificación de variantes genéticas en base de la frecuencia de alelos y la fuerza del efecto genético (*odds ratio*) ¹⁶⁹.

Adaptación de fuente: http://www.nature.com/nature/journal/v461/n7265/fig_tab/nature08494_F1.html.

Lo normal es que este tipo de variaciones presenten dos alelos diferentes. No obstante, puede darse el caso de que una variante esté caracterizada por más de dos alelos si se produce una nueva mutación en la misma posición y esta se transmite a su descendencia, sin embargo, esto es mucho menos frecuente. En el caso de que presenten dos alelos, estos pueden generar las tres combinaciones posibles que se denominan genotipos y se describen a continuación. También se representan de una forma gráfica en la figura 1.6.

- Homocigoto común: formado por los dos alelos mayoritarios o más frecuentes (AA).
- Heterocigoto: formado por una copia del alelo mayoritario y una copia de un alelo minoritario (Aa).
- Homocigoto minoritario: formado por los dos alelos minoritarios o menos frecuentes en la población (aa).

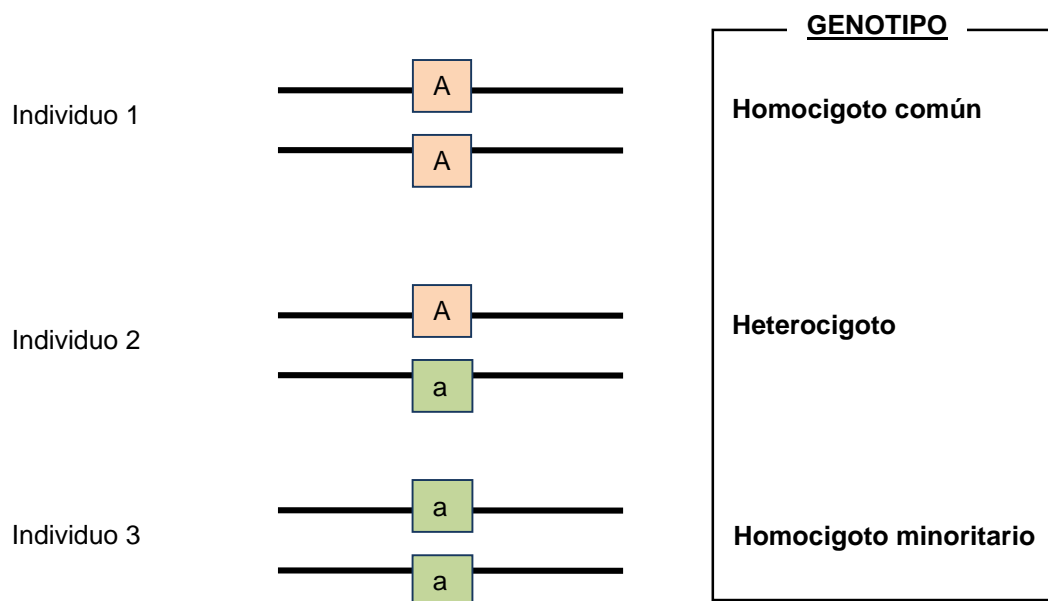


Figura 1.6- Genotipos de un polimorfismo de un solo nucleótido.

En base a esta configuración se han establecido una serie de modelos genéticos ¹⁷⁰ que determinan el carácter dominante y recesivo de cada uno de los alelos suponiendo que el alelo variante modifica el riesgo de la enfermedad de interés. Como se puede ver en la tabla 1.9, entre los modelos más habituales se encuentran el:

- **Modelo codominante:** En este modelo se considera a los tres genotipos de forma individual y por tanto cada uno representa un riesgo independiente.
- **Modelo dominante:** Este modelo considera el alelo menos frecuente como dominante, lo cual quiere decir que solo se necesita una copia de este alelo para crear el efecto (“aa” y “Aa” tendrán el mismo efecto frente a “AA”).
- **Modelo recesivo:** Este modelo considera el alelo menos frecuente como recesivo, lo que quiere decir que se necesitan dos copias del alelo minoritario para tener un efecto (“aa” frente a “Aa” y “AA” que tendrán el mismo efecto).
- **Modelo aditivo:** Este modelo, como su propio nombre indica hace referencia a un efecto aditivo de los alelos, de manera que cada copia del alelo variante modifica el riesgo en una cantidad aditiva. Por tanto, los homocigotos variantes “aa” tienen el doble de riesgo que los heterocigotos “Aa”.

Tabla 1.9 - Modelos genéticos posibles			
Codominante	Dominante	Recesivo	Aditivo
AA= x	aa + Aa= x	aa= x	AA= x1
Aa= y	AA= y	Aa + AA= y	Aa= x2
Aa= z			aa= x4
Fuente: ¹⁷⁰ .			

Por otro lado, hay que tener en cuenta que los SNPs pueden heredarse de forma independiente o también de forma conjunta, de manera que la transferencia de una generación a otra no se lleva a cabo de forma aleatoria. Este tipo de transferencia se denomina ligamiento. La frecuencia con la que dos polimorfismos se heredan de forma conjunta se denomina desequilibrio de ligamiento (*Linkage disequilibrium* o LD) ^{170,171}.

En el caso en que los alelos se transfieran en bloques de varios polimorfismos se genera lo que se denomina haplotipo (combinación de alelos de diferentes *loci* pertenecientes a un cromosoma que son heredados de forma conjunta). En estos casos, la identificación de uno de los marcadores genéticos del bloque, puede servir para identificar el bloque entero y de este modo, existe la posibilidad de ahorrar costes. Una de las herramientas utilizadas para determinar si un polimorfismo se encuentra en un haplotipo es el programa Haploview junto con la herramienta *Tagger* que permite la selección evaluación de los SNPs marcadores, ambos del *Broad Institute* y que utilizan la base de datos del Proyecto Internacional HAPMAP ^{171 172}.

A su vez, a la hora de realizar estudios nutrigenéticos, hay que tener en cuenta el equilibrio de *Hardy-Weinberg* (HWE). El HWE determina la independencia de alelos en un *locus* entre los dos cromosomas homólogos, determinando la relación entre las frecuencias genotípicas y alélicas. El análisis se puede realizar mediante diferentes test estadísticos. Si la muestra está en equilibrio de *Hardy-Weinberg* quiere decir que la transferencia de una generación a otra se ha producido de forma aleatoria ^{173,174}.

El no cumplimiento del equilibrio puede indicar sesgos en la muestra, factores que afecten a las frecuencias alélicas o problemas en el genotipado. Entre los factores de incumplimiento de este equilibrio destacan: Un apareamiento no aleatorio o poco tamaño muestral.

A la hora de seleccionar polimorfismos genéticos es fundamental definir los criterios de selección en función de las necesidades y características del estudio que se va a realizar. Para ello es necesario seleccionar los genes implicados en rutas metabólicas relacionadas con el fenotipo o enfermedad que se quiere estudiar. A su vez, se hace necesario la selección de variantes genéticas que sean potencialmente funcionales según las regiones en las que se localicen. Otro factor a tener en cuenta y que dependerá del tamaño y la etnia de la muestra del estudio, es la selección de polimorfismos en base a sus frecuencias alélicas ^{175 176}.

1.4.2 NUTRIGENÉTICA

En los últimos años, los avances en técnicas de biología molecular y la consecución del proyecto Genoma Humano han permitido integrar la nutrición y la genética, con el objetivo de relacionar el componente genético con el desarrollo de determinadas enfermedades. Posteriormente, la investigación ha ido encaminada a estudiar la relación existente entre la dieta, los factores genéticos y las patologías, desarrollándose así la nutrigenómica y la nutrigenética, disciplinas englobadas dentro de la Genómica Nutricional ¹⁷⁷.

Esta área de investigación pretende ampliar el conocimiento para prevenir enfermedades relacionadas con la alimentación, ya que existen numerosas evidencias científicas que demuestran que los hábitos alimentarios juegan un papel destacado sobre la salud de los individuos debido a que determinadas variaciones genéticas pueden influir en la respuesta que provocan componentes de la dieta sobre el organismo, pudiendo producir diferentes respuestas según el componente genético de cada persona.

La nutrigenética es la disciplina que estudia las diferentes respuestas fenotípicas a la dieta en función del genotipo de cada individuo. Es decir, cómo dependiendo de las variantes genéticas propias de cada individuo, existen diferentes respuestas a los componentes de la alimentación ¹⁷⁷. Así, la interacción gen-dieta describe la implicación de las variaciones genéticas sobre elementos de la alimentación, los cuales se pueden expresar de diferente forma en cada sujeto, por ejemplo: mediante un aumento de peso, un incremento de grasa abdominal, una disminución de la concentración plasmática de colesterol o disminución de la presión arterial.

Este tipo de interacción se aplica por tanto, al estudio del efecto de un componente dietético sobre el fenotipo específico según un polimorfismo genético determinado. De esta manera, estos polimorfismos genéticos pueden llegar a convertirse en marcadores de susceptibilidad a una determinada enfermedad.

1.4.3 INTERES BIOSANITARIO

Es indudable que en los últimos años se ha despertado un creciente interés sobre el estudio de la nutrigenética en las áreas de la biología y salud. Este hecho se fundamenta en los posibles beneficios que se pueden llegar a obtener de los estudios que relacionan la genética con la

alimentación. El objetivo no es otro que alcanzar los conocimientos y herramientas necesarias para llevar a cabo una nutrición personalizada³⁵.

Entre las aplicaciones de la nutrigenética destacan:

- La prevención y tratamiento personalizados de determinadas enfermedades en base a recomendaciones nutricionales específicas para cada individuo.
- Aumento de la probabilidad de los efectos beneficiosos de los alimentos para los consumidores.

Las consecuencias de los avances en nutrigenética y la consecución de dichos objetivos se podrán trasladar a unos mejores niveles de salud y calidad de vida de la población, con la consecuente reducción de gastos sanitarios.

La necesidad de mejorar la salud de la población mediante la alimentación, es fundamental ya que la esperanza de vida aumenta con los años y por tanto la edad media de la población cada vez es más elevada, a la vez de que aumentan los niveles de enfermedades relacionadas con la alimentación como es el caso de la obesidad y las enfermedades cardiovasculares.

Hasta ahora las recomendaciones nutricionales ofrecidas son generales para a la población y se basan en función de las enfermedades padecidas o de los diferentes estados fisiológicos por los que pasan los individuos a lo largo de su vida. Los objetivos de estas recomendaciones están basados para englobar a toda la población que sufra dichas patologías. Sin embargo, como se puede ver en la figura 1.7, la tendencia actual va encaminada a elaborar recomendaciones de ingestas personalizadas teniendo en cuenta no solo las características fisiológicas y patológicas del individuo, sino también basándose en el perfil genético, pasando de las recomendaciones nutricionales generales, a enfocarlas a las características particulares de cada individuo.



Figura 1.7- Evolución de los objetivos nutricionales a lo largo de los años.

Otra aportación de la nutrigenética es la aplicación de los conocimientos al desarrollo de alimentos personalizados, específicos para determinados grupos genéticos, los cuales se beneficiarán de forma especial al consumirlos.

Es sabido que determinados alimentos funcionales, aunque provocan efectos beneficiosos sobre la población general, no provocan la misma respuesta en toda la población. Estas diferencias de respuesta, podrían estar condicionadas por la variabilidad genética, por lo que el estudio de la respuesta a un alimento funcional podría dirigir mejor el perfil del consumidor, el cual podría beneficiarse especialmente del producto.

1.4.3.1 Aplicaciones de la nutrigenética en la obesidad y enfermedades cardiovasculares

Puesto que la prevalencia de obesidad y las enfermedades cardiovasculares están alcanzando niveles alarmantes, la aplicación de la nutrigenética como parte de la prevención y tratamiento en dichas patologías puede resultar de gran interés para la población, los sistemas sanitarios, el progreso a nivel científico y la industria alimentaria.

Un ejemplo de estudio sobre cómo la dieta supone un factor de riesgo sobre la obesidad en función de la genética cada individuo, es el que relaciona el polimorfismo -265 T/C perteneciente al gen que codifica la apolipoproteína A2, con el consumo de grasa saturada y el riesgo de padecer obesidad. Los estudios han mostraron inicialmente que los portadores del genotipo CC perteneciente a esta variante, se asociaban con un riesgo mayor de obesidad ¹⁷⁸.

Sin embargo, estudios posteriores mostraron que los portadores de dicho genotipo eran susceptibles de perder peso o mantener un peso saludable si reducían el consumo de grasas saturadas, en comparación con los portadores del genotipo CT o TT, a los cuales esta reducción puede beneficiar para otros motivos pero puede que no sea hacia la pérdida de peso ¹⁷⁹.

Otro ejemplo de aplicación nutrigenética, queda representado por los resultados obtenidos en el grupo de Nutrición y Ensayos Clínicos de IMDEA Alimentación, donde se observó que la presencia de la variante rs3749474 perteneciente al gen CLOCK, podría influir en el efecto producido por la reducción de grasa en la dieta sobre las variables asociadas con la obesidad. De esta manera, los participantes portadores de este polimorfismo, podrían llegar a beneficiarse más que otros, del tratamiento de pérdida de peso mediante la restricción de grasa en la dieta. Por lo tanto, el tratamiento de la obesidad podría personalizarse, en función del componente genético ¹⁸⁰.

De la misma forma, otro estudio muestra como individuos obesos, portadores del genotipo homocigoto (T/T) perteneciente al rs7903146 TCF7L2, presentan mayor sensibilidad a una dieta baja en grasa y rica en carbohidratos frente a una dieta alta en grasa, con respecto a la pérdida de peso ¹⁸¹.

Otro ejemplo, relativo a uno de los polimorfismos más estudiados en obesidad, es el observado en el polimorfismo rs9939609 FTO y su interacción con la composición de macronutrientes en dietas de pérdida de peso. De esta manera, los resultados en un estudio mostraron que los portadores del alelo A consumidores de una dieta baja en grasas y rica en hidratos de carbono, presentaron un menor riesgo de abandono frente a los portadores del genotipo TT, y a su vez, estos últimos portadores, presentaron menor reducción del gasto energético en reposo y mayores reducciones sobre la liberación de insulina con una dieta baja en grasas frente a una rica en dicho nutriente¹⁸².

Un ejemplo de la aplicación de la nutrigenética en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares consiste en la respuesta del consumo de ácido fólico de acuerdo a la presencia de determinadas variantes genéticas. Así, se ha comprobado que los portadores homocigotos TT para el polimorfismo C677T perteneciente al gen MTHFR, disminuyen los niveles de homocisteína cuando los aportes de folato de la dieta son suficientes ³⁵.

Otro ejemplo, es el relativo al consumo de ácidos grasos polinsaturados, donde resultados de un estudio mostraron que los niveles totales de ácidos grasos omega-6 en fosfolípidos

plasmáticos y PCR, habían sido modulados por polimorfismos pertenecientes a los genes PLA2G4A y PLA2G6, solos o en combinación con la suplementación de aceite de pescado ¹⁸³.

A su vez, la aplicación de la nutrigenética también se ha llevado a cabo relacionando polimorfismos genéticos con la dieta y varios procesos patológicos lo cual puede llegar aportar un mayor conocimiento científico sobre los mecanismos fisiopatológicos que relacionan dichas enfermedades. Este es el caso de un estudio que sugiere que la variante rs16147 perteneciente al gen NPY, puede modular la asociación entre la ingesta de grasas en la dieta y los cambios sobre la presión arterial, de manera que el alelo C de este polimorfismo, ejerce un efecto beneficioso a largo plazo en la reducción de la presión arterial en respuesta una la dieta baja en grasa en obesos e hipertensos¹⁸⁴.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis científica de la presente Tesis Doctoral es la siguiente:

“Es posible diseñar estrategias nutricionales efectivas para la prevención y terapia de las enfermedades crónicas, si se tiene en cuenta que las características genéticas de las personas determinan la susceptibilidad al efecto de dichas estrategias nutricionales”.

En la presente Tesis Doctoral se ha trabajado para encontrar evidencias que confirmen dicha hipótesis. Debe tenerse en cuenta que desde el momento en que se formuló esta hipótesis y se inició la Tesis Doctoral hasta el momento actual, las contribuciones científicas que se han producido a nivel internacional sobre el tema son muy numerosas, aun cuando el tiempo transcurrido no ha sido muy largo. También es relevante señalar que durante el transcurso de las investigaciones que han conducido a esta Tesis Doctoral se ha producido un amplio desarrollo de las tecnologías -ómicas, que continúa en la actualidad, y que cada día abre nuevas posibilidades de utilización de la alimentación como una herramienta eficaz en la prevención y tratamiento de enfermedades.

En consecuencia, es conveniente ampliar la hipótesis en el sentido de que **“El mejor conocimiento de los mecanismos de interacción entre genes y nutrientes, que permite la disponibilidad de tecnologías como la genómica, conduce a la obtención de estrategias nutricionales y alimentos funcionales eficaces para la mejora de la salud a través de la alimentación”.**

En consecuencia, el objetivo general de esta Tesis Doctoral es contribuir al conocimiento de interacciones gen-dieta y a la metodología necesaria para evaluar su relevancia en la medida de la efectividad de productos alimentarios de uso específico para la salud. Se pretende con ello, realizar una aportación científica que sirva para reforzar o cuestionar la hipótesis formulada y en definitiva, la conveniencia de los planteamientos de la hoy denominada “Nutrición Personalizada”.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Constituir una Plataforma de estudios nutrigenéticos en humanos, para contribuir a la investigación en nutrición personalizada, como herramienta para mejorar la salud de la población.
- 2) Estudiar la asociación fenotipo-genotipo de la población caracterizada en la constitución de la Plataforma de estudios nutrigenéticos en humanos.
- 3) Estudiar las interacciones gen-dieta para determinar si productos alimentarios de uso específico para la salud provocan efectos biológicos desiguales en personas de perfil genético diferente.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3 MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE LA POBLACIÓN DE LA PLATAFORMA CANTOBLANCO PARA ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN Y ENSAYOS CLÍNICOS DE INTERVENCIÓN

El presente trabajo se ha realizado en la Plataforma “Cantoblanco” de Genómica Nutricional y Alimentación, del Instituto IMDEA Alimentación, durante el periodo 2010-2016. Esta Plataforma ha sido creada para realizar estudios de cómo el genoma de los individuos interactúa con los alimentos de la dieta y estos a su vez con el genoma, para conocer los beneficios o perjuicios de determinados nutrientes e ingredientes alimentarios en la salud del individuo.

La caracterización se ha llevado a cabo mediante un estudio observacional y transversal, realizándose en una única visita de evaluación y toma de muestras.

3.1.1 RECLUTAMIENTO DE PARTICIPANTES Y CONSIDERACIONES ÉTICAS

El reclutamiento de los voluntarios se ha desarrollado, en su mayor parte, en el Campus de “Cantoblanco” de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM) y ha incluido a estudiantes, personal docente e investigador de la Universidad, de centros pertenecientes al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), de otros centros de investigación (Parque Científico de Madrid y Hospital Universitario La Paz), así como personal de administración y servicios. Además, se difundió la convocatoria por la página web de IMDEA Alimentación y otros medios de comunicación.

La captación de voluntarios se ha realizado tras la autorización de la UAM, CSIC, Instituto Madrileño de Estudio Avanzados (IMDEA) y Parque Científico de Madrid, a través de las siguientes acciones:

- Envío de correos electrónicos informativos.
- Colocación de carteles y reparto de trípticos informativos en los centros de trabajo. En el caso particular de los estudiantes de grado y personal investigador en formación, la captación se ha realizado mediante carteles informativos colocados en los tablones de

anuncios de las facultades, departamentos, aulas, cafeterías, residencias universitarias, pabellones deportivos y lugares de paso.

La selección de los sujetos ha sido realizada en base a los siguientes criterios de inclusión: ser mayor de edad y menor de 70 años. Como criterios de exclusión: padecer alguna enfermedad grave (renal, hepática u otra que condicione la alimentación o el estilo de vida), sujetos con demencia, con función cognitiva disminuida, estar embarazada o en periodo de lactancia. En la figura 3.1 se presenta un diagrama sobre el reclutamiento y participación en el estudio.

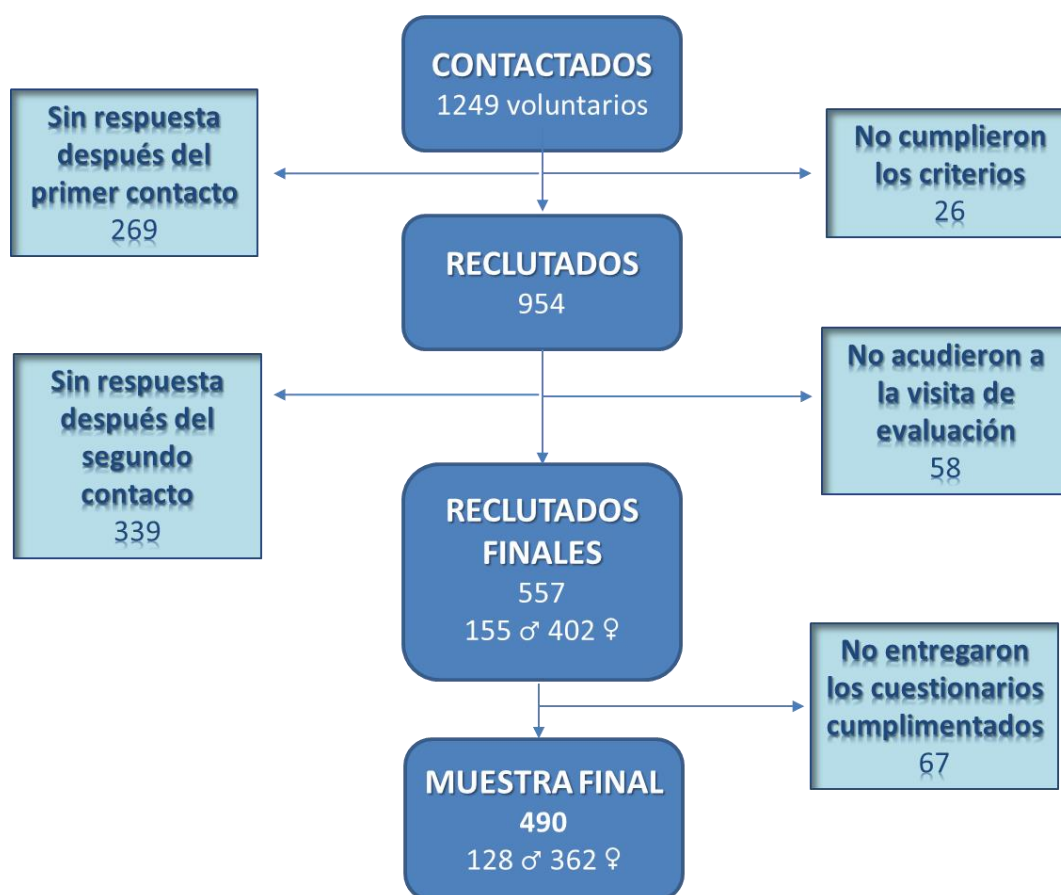


Figura 3.1- Diagrama de reclutamiento y participación en el estudio.

El estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética de Investigación de la UAM (CEI 27-666) que se ajusta a las normas éticas recogidas en la Declaración de Helsinki ¹⁸⁵. Para su ejecución se han contemplado las recomendaciones contenidas en el documento sobre “Aspectos éticos de la intervención de estudiantes de la UAM como sujetos de investigación”, de 24 de enero 2008. Por otro lado, el proyecto ha sido elaborado contemplando las disposiciones generales de la Ley 14/2007, de 3 de Julio, de Investigación Biomédica (BOE núm. 159, 04/07/2007) y el Real Decreto 1716/2011, de 18 de octubre relativas a la obtención de las muestras,

información previa a la utilización de la muestra biológica, consentimiento sobre la utilización de la muestra biológica, conservación y destrucción de las muestras, e informe del Comité de Ética de la Investigación. A su vez, se ha tenido procedido según la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal, así como el Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento de Desarrollo de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre.

A cada participante se le ha entregado una copia de la hoja de información y consentimiento informado firmado por el investigador principal (anexo 1), se le ha informado del estudio y a continuación, ha firmado el consentimiento informado.

3.1.2 ALMACENAMIENTO DE DATOS Y MUESTRAS

Con el objetivo de almacenar todos los datos recogidos en la Plataforma “Cantoblanco” de Genómica Nutricional y Alimentación, se ha diseñado y constituido una “Aplicación web de control de proyectos” propia, que ha permitido el control de datos y muestras de diferentes proyectos de investigación en el ámbito de la nutrición.

El diseño de la aplicación se ha llevado a cabo teniendo en cuenta las siguientes funcionalidades:

- Capacidad de albergar y gestionar un elevado volumen de datos fenotípicos y genotípicos para su posterior análisis.
- Capacidad de introducir cuestionarios nutricionales validados y personificados, así como datos antropométricos, médicos y bioquímicos con la posibilidad de que las encuestas se rellenen directamente en soporte informático facilitando la entrada de datos.
- Capacidad de mantener la seguridad de los datos y su protección cumpliendo con la Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal, así como el Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre, por el que se aprueba el Reglamento de Desarrollo de la Ley orgánica 15/1999, de 13 de diciembre.

La estructura de la aplicación se ha diseñado de forma versátil para permitir al usuario crear cuestionarios de datos según las necesidades de cada proyecto. Para ello, su diseño se ha dividido en varios módulos representados en la figura 3.2:

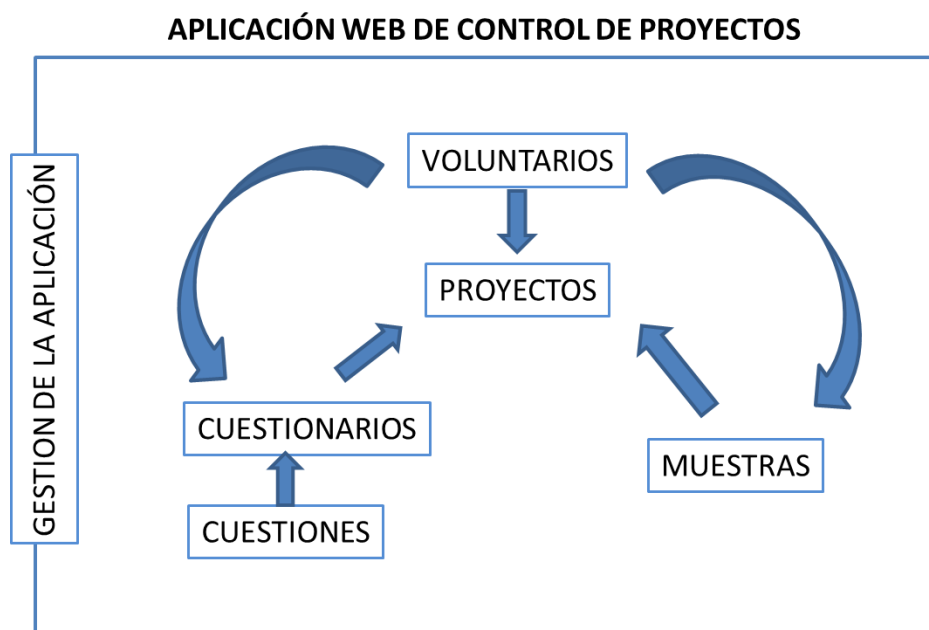


Figura 3.2.- Estructura de la Aplicación web de control de proyectos de la Plataforma GENYAL.

Las muestras de sangre obtenidas en este estudio se han almacenado en congeladores con una temperatura de -80°C que cuentan con sistemas de vigilancia 24 horas, así como apoyo de CO_2 . Se ha comunicado su inscripción en el Registro Nacional de Biobancos (Sección de Colecciones) con referencia: C.0003312.

Las muestras de raspado bucal obtenidas en este estudio se han almacenado y secado a temperatura ambiente durante 24 horas una vez recogidas, ya que mediante este procedimiento se han conseguido mejores calidades de ADN tras el proceso de extracción, comparando con otros tiempos de almacenamiento.

Las muestras de ADN obtenidas de sangre y raspado bucal se han almacenado en el congelador a una temperatura de -20°C , los cuales cuentan con sistemas de vigilancia 24 horas. Al igual que en el caso de las muestras de sangre, se ha comunicado su inscripción en el Registro Nacional de Biobancos (Sección de Colecciones) con referencia: C.0003312.

Las muestras biológicas han sido codificadas mediante disociación por la aplicación informática, creada para generar automáticamente un código único alfanumérico de cada muestra, quedando de esta manera catalogadas informáticamente.

3.1.3 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

3.1.3.1 *Registro de datos sociológicos, sanitarios y de estilo de vida*

La toma de datos de carácter sociológico se ha llevado a cabo mediante una entrevista en la cual se ha recogido información de los participantes sobre los siguientes aspectos ¹⁸⁶:

- Fecha de nacimiento.
- Estado civil que se ha clasificado en: soltero, casado, viudo, divorciado y separado.
- Etnia que se ha clasificado en: europeo mediterráneo, latinoamericano y otros.
- Nivel de estudios que se ha clasificado en: ni leer ni escribir, primaria, secundaria, universitario de grado medio y universitario de grado superior.
- Situación laboral que se ha clasificado en: trabajando, incapacidad permanente, ama de casa, estudiante, jubilado, baja más de tres meses, paro con subsidio y paro sin subsidio.

Igualmente, se ha recogido información sobre diferentes datos sanitarios:

- Presencia de patologías actualmente declaradas: hipertiroidismo, hipotiroidismo, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hipertensión arterial, depresión, diabetes, intolerancia a la lactosa, otras enfermedades.
- Consumo de medicación o suplementos de forma habitual: anticonceptivos orales, anticonceptivos no orales, antidepresivos, antiácidos, antihistamínicos, antiinflamatorios, suplementos de hierro, suplementos de calcio, hipotensores, hormona tiroidea, otras medicaciones habituales.
- Presencia de antecedentes de enfermedad en familiares de primer y segundo grado: enfermedades cardiovasculares, hipertensión arterial, dislipemia, obesidad, diabetes tipo II, enfermedad oncológica, otras enfermedades.

A sí mismo, se han recogido los siguientes datos sobre el estilo de vida y hábitos de los participantes:

- Grado de apetito mediante una escala del 1 al 5. Considerándose 1 muy poco apetito, 3 un término medio y 5 mucho apetito.
- Cantidad de comidas diarias realizadas de media.

- Consumo diario de cigarrillos al día según la siguiente clasificación: 0, 1-5, 5-10, 10-20, 20-30, más de 30.
- Cantidad de copas de alcohol consumidas a la semana según la siguiente clasificación: 0, 0-5, 5-10, 10-15, más de 15.
- Porcentaje de alcohol fermentado con respecto al consumo total.
- Porcentaje de alcohol destilado con respecto al consumo total.
- Práctica de ejercicio físico a la semana según la siguiente clasificación: 0, 1, 2, 3, 4-5 y más de 5.
- Parámetros psicológicos clasificados en: estrés, ansiedad, depresión, trastornos de conducta alimentaria, otros, ninguno.

3.1.3.2 *Registro de alimentos y bebidas de 72 horas*

Para la valoración general del consumo de alimentos, la cuantificación de la ingesta aproximada de calorías, de macronutrientes y micronutrientes de los sujetos de estudio, así como de la calidad de la dieta, se ha empleado un "Registro del consumo de alimentos y bebidas de 72 horas" reflejado en el anexo 2. Se trata de un método cuantitativo y prospectivo con formato estructurado en las diferentes comidas (desayuno, comida, merienda, cena, entre horas...), donde se contempla la hora, el lugar, el menú y los ingredientes de cada plato ^{187,188}.

Para su realización, se solicitó a los participantes que anotaran durante tres días seguidos, uno de los cuales debía ser en fin de semana o festivo, todos los alimentos y bebidas ingeridos. A su vez, se les indicó que apuntaran las cantidades en pesos, en la medida de lo posible, o en medidas caseras, todos los alimentos y bebidas consumidas, tanto fuera como dentro del hogar, intentando así conseguir la máxima veracidad.

Una vez obtenidos los datos de consumo de alimentos y bebidas, se han introducido en el programa informático para la valoración de dietas y gestión de datos de alimentación DIAL (versión 2.16 de enero de 2012. Alce Ingeniería)¹⁸⁹. El consumo de energía se ha calculado a partir de las cantidades de macronutrientes (hidratos de carbono, proteínas y grasas) y cantidad de alcohol consumidos, empleándose los factores de conversión propuestos por la Organización de Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) ⁶¹.

Energía (se ha calculado a partir de las cantidades de proteína, grasa e hidratos de carbono y alcohol):

- Proteínas: 4 kcal/g.
- Grasa: 9 kcal/g.
- Hidratos de carbono: 4 kcal/g.
- Alcohol: 7 kcal/g.

Macronutrientes:

- Proteínas.
- Hidratos de carbono: los totales se refieren a la suma de los hidratos de carbono disponibles (azúcares sencillos e hidratos de carbono complejos) y no disponibles (fibra soluble, insoluble y almidón resistente).
- Lípidos: los totales constituyen la suma de todas las fracciones liposolubles del alimento (triglicéridos, fosfolípidos, esteroides, etc.).

Micronutrientes:

Vitaminas:

- Vitamina B1 (Tiamina).
- Vitamina B2 (Riboflavina).
- Vitamina C (Ácido ascórbico).
- Vitamina B12 (Cianocobalamina).
- Ácido fólico.
- Vitamina D.

Minerales y elementos traza:

- Hierro.
- Zinc.
- Magnesio.
- Iodo.

Para evaluar el nivel de adecuación del consumo de nutrientes a las recomendaciones nutricionales, se han comparado las ingestas de los sujetos estudiados con las tablas de Ingestas Recomendadas (IR) de energía y nutrientes para la Población Española ¹⁹⁰. A su vez, también se han presentado las cantidades diarias recomendadas según la Directiva 2008/100/CE de la Comisión de 28 de octubre de 2008 por la que se modifica la Directiva 90/496/CEE del Consejo, relativa al etiquetado sobre propiedades nutritivas de los productos alimenticios, en lo que respecta a las cantidades diarias recomendadas, los factores de conversión de la energía y las definiciones.

Habitualmente, las recomendaciones dietéticas incluyen un margen de seguridad que cubre las variaciones interindividuales. Una de las formas utilizadas para establecer el límite de recomendaciones de nutrientes consiste en utilizar el valor de 2/3, es decir el 67 % de las

recomendaciones de los mismos como límite, por debajo del cual se podría considerar un factor de riesgo para el nutriente específico ¹⁹¹. En base a ello, en este estudio se han considerado los nutrientes que en la población se han quedado por debajo del 67 % de las IR.

Los datos recogidos en el cuestionario de 72 horas también se han utilizado para estudiar la calidad de la dieta mediante el cálculo de los siguientes parámetros según Ortega *et al.* (2004):

- Perfil calórico: porcentaje de energía aportado por los macronutrientes, con respecto al total.
- Perfil lipídico: porcentaje de energía aportado por los ácidos grasos, con respecto al total.

3.1.3.3 *Registro de la frecuencia de consumo de alimentos*

Para calcular la ración diaria de los diferentes grupos de alimentos que se consumen y compararla con las raciones mínimas recomendadas por la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria ¹⁹², se ha empleado una adaptación del cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos de Martín-Moreno *et al.* (1993) validado y formado por 139 preguntas, presentado en el anexo 3, donde se ha eliminado la pregunta: “marca de aceite de oliva que usa habitualmente” ¹⁹³. Este cuestionario recopila información sobre el consumo detallado de 135 alimentos y bebidas a lo largo de un año, lo que permite realizar correlaciones entre niveles de consumo y diferentes aspectos fenotípicos y genotípicos del colectivo.

Las raciones diarias se han agrupado según Ortega *et al.* (2004) y su consumo, clasificado según la SENC (2004) para su posterior análisis por tipos de alimentos de la siguiente manera ^{190,192}:

- Lácteos: Leche y derivados lácteos: valores recomendados de 2 – 4 raciones al día.
- Carnes pescados y huevos: valores recomendados, 2 raciones al día.
- Cereales y legumbres: valores recomendados de 4 – 6 raciones al día.
- Verduras: valores recomendados de más de 2 raciones al día.
- Frutas: valores recomendados de más de 3 raciones al día.
- Bebidas alcohólicas: fermentadas (vino o cerveza) o destiladas.

3.1.3.4 Registro de actividad física

Para la determinación cuantitativa de la actividad física realizada por los participantes se ha utilizado la versión del “Cuestionario de actividad física en el tiempo libre de *Minneosta*”, validada para la población española en hombres y mujeres ^{194,195}. Dicho cuestionario, presentado en el anexo 4, recoge diferentes actividades físicas realizadas durante la última semana y el último año a la toma del registro, así como los minutos empleados en cada actividad y el número de días de práctica. En total, el cuestionario consta de 67 actividades físicas bien definidas, englobadas en diferentes grupos que van desde actividades realizadas en casa y el jardín, así como actividades cotidianas, de mantenimiento físico, acuáticas, de invierno y otras. Por otro lado, se ha establecido un tiempo estandarizado para las siguientes actividades: subir escaleras, cada piso supone ½ minuto; una partida de billar, 10 minutos; un set de tenis individual, 20 minutos; un set de tenis dobles, 15 minutos; golf de 9 hoyos, 90 minutos.

Con los datos obtenidos del cuestionario se ha clasificado a los participantes en sedentarios y no sedentarios, siguiendo los criterios que se describen a continuación.

La determinación del gasto de energía en cada tipo de actividad se ha realizado empleando un compendio de actividades físicas ¹⁹⁶. Este compendio codifica cada tipo de actividad por su función y características específicas, y asigna una unidad de intensidad basada en su tasa de gasto energético expresada en MET (equivalente metabólico), que equivale en torno a 1 Kcal/kg/h y que supone aproximadamente el gasto de energía en un estado de reposo.

La fórmula que se ha empleado para el cálculo del Gasto de Energía por Actividad Física (GEAF) ha sido la siguiente: $GEAF = I \times N \times T$; donde “I” representa el grado de intensidad para cada actividad física en kilocalorías/minuto; “N”, el número de veces que esa actividad física se desarrolló en un periodo determinado de tiempo; y “T”, el tiempo en minutos gastado en cada sesión.

Tomando como base las recomendaciones de la Asociación americana del corazón ¹⁹⁷, en base a la mejora o mantenimiento de la salud, se han considerado como sedentarios aquellos voluntarios que no han cumplido con las siguientes recomendaciones: realización de ejercicios aeróbicos de intensidad moderada con un mínimo de 30 minutos en 5 días a la semana, o realización de ejercicios de alta intensidad aeróbica durante un mínimo de 20 minutos en 3 días cada semana. Considerando de media 4,5 METs para las actividades moderadas, estas recomendaciones suponen un gasto igual o superior a 675 Kcal. a la semana. En el caso de

actividades intensas, considerando de media 7 METs, supone un gasto igual o superior a 420 Kcal. a la semana ¹⁹⁸.

3.1.3.5 *Determinación de medidas antropométricas y constantes vitales*

Para la determinación antropométrica se han recogido las diferentes variables cumpliendo con los siguientes procedimientos.

Peso habitual

Con el objetivo de conocer la variación de peso con respecto al peso actual, se les ha preguntado a los voluntarios por su peso habitual (en los últimos seis meses).

Altura

La medición de la altura se ha realizado mediante un tallímetro de precisión milimétrica (Tallímetro Leicester- Biológica Tecnología Médica SL, Barcelona), con la persona posicionada de espaldas al mismo sobre la superficie del tallímetro, descalza y sin chaqueta, con los talones juntos, con la posición de la cabeza en el plano horizontal y postura corporal recta. El brazo móvil se ha apoyado sobre la superficie de la cabeza formando un ángulo recto. Los valores se han expresado en centímetros, redondeando a 0.5 cm.

Peso actual

Para la medición del peso, se ha empleado un analizador de composición corporal (Monitor de composición corporal BF511- OMRON HEALTHCARE UK, LT, Kioto, Japón). Las medidas se han tomado según las instrucciones del aparato, colocando la báscula sobre una superficie lisa y firme, con el participante descalzo, vestido ropa ligera, libre de objetos superfluos, y con una postura corporal recta. El peso se ha expresado en kilogramos con un decimal. La precisión del peso es de 0 - 40 kg: ± 0.4 ; y de 40 -150 kg: 1 %.

Índice de Masa Corporal (IMC)

Este parámetro se ha calculado a partir de las medidas de peso y talla según la fórmula del Índice de *Quetelet* o Índice de masa corporal ¹⁹⁹:

$$\text{IMC (Kg/m}^2\text{)} = \frac{\text{Peso (Kg)}}{\text{Talla (m}^2\text{)}}$$

El valor obtenido se ha clasificado según el Consenso SEEDO 2007 mostrado en la tabla 3.1:

Tabla 3.1 - Clasificación de peso en personas adultas según el IMC	
Clasificación	Valores límite del IMC (kg/m ²)
Peso bajo	<18.5
Peso normal	18.5 - 24.9
Sobrepeso grado I	25.0 - 26.9
Sobrepeso grado II	27.0 - 29.9
Obesidad de tipo I	30.0 - 34.9
Obesidad de tipo II	35.0 - 39.9
Obesidad de clase III (mórbida)	40.0 – 49.9
Obesidad de clase IV (extrema)	≥ 50.0
IMC, Índice de masa corporal. Fuente, ² .	

Circunferencia de la cintura y cadera

La circunferencia de la cintura y la cadera han sido determinadas mediante una cinta métrica homologada, flexible (rango 0-150 cm) de un milímetro de precisión.

La medida de la circunferencia de la cintura ha sido tomada manteniendo a la persona en posición erguida, repartiendo el peso equitativamente en ambas piernas y con los brazos relajados a los costados del cuerpo, en el punto medio de la menor distancia vertical entre la última costilla y la cresta ilíaca, con la cinta pegada a la piel pero sin comprimir ²⁰⁰.

La circunferencia de la cadera ha sido medida manteniendo a la persona en posición erguida, con los brazos acostados sobre el cuerpo y los pies juntos. Se ha medido sobre la máxima circunferencia por encima de los glúteos y pasando por el pubis, con la cinta pegada al cuerpo pero sin comprimir ²⁰⁰.

En ambas mediciones se ha asegurado que la cinta está al mismo nivel por delante y por detrás. Se ha anotado la medida en centímetros con un decimal.

Los datos referidos a la circunferencia de la cintura de población española permiten estimar parámetros de riesgo cardiovascular a partir de 95 cm en varones y de 82 cm en mujeres. En la tabla 3.2 se muestran los valores de dicho riesgo según la distribución de la grasa corporal ²⁰¹.

Tabla 3.2 - Valores de riesgo cardiovascular según la distribución de grasa corporal		
	Valor límite hombres	Valor límite mujeres
Circunferencia cintura (cm)	>95 hombres	>82 mujeres
Fuente: 2,201.		

Análisis de Impedancia Bioeléctrica

La medición de la grasa corporal y muscular se ha realizado mediante la técnica de impedancia bioeléctrica. Para ello se ha empleado un analizador de composición corporal (Monitor de composición corporal BF511- OMRON HEALTHCARE UK, LT, Kyoto, Japón). El equipo utiliza ocho sensores para medir el nivel total de composición corporal, cuatro para manos y cuatro para pies, con el objetivo de proporcionar una medición precisa y evitar la influencia de las fluctuaciones. El equipo emite una corriente eléctrica de muy baja intensidad: 50kHz e inferior a 500 µA a través del cuerpo para determinar la cantidad de tejido graso.

La medida se ha realizado en los participantes siguiendo las instrucciones del aparato. Entre ellas destaca la realización de la medida al menos dos horas después de tomar una comida, sin que el participante haya realizado de forma inmediata ejercicio vigoroso, sin que haya bebido alcohol o grandes cantidades de agua o después de un baño o una sauna. La medida se ha practicado con el participante descalzo, con los brazos elevados hasta formar aproximadamente unos 90° y los codos extendidos hasta quedar rectos.

El resultado de la medición se ha expresado en porcentaje de grasa corporal que se refiere a la cantidad de masa grasa del cuerpo con respecto al peso total, expresado en forma de porcentaje. En este porcentaje se ha incluido tanto la grasa visceral como la subcutánea.

$$\text{Porcentaje de grasa total (\%)} = \frac{\text{Masa de grasa corporal (kg)}}{\text{Peso corporal (kg)}} * 100$$

El valor obtenido se ha clasificado según el Consenso SEEDO (2000) como se puede ver en la tabla 3.3.

Tabla 3.3 - Clasificación del porcentaje de grasa corporal (%)		
	Hombres	Mujeres
Límite	21 - 25 %	31 - 33 %
Obesidad	> 25 %	> 33 %
Fuente: ²⁰¹ .		

Los resultados de la medición de grasa visceral se han presentado según las cifras de *Omron Healthcare*, según muestra la tabla 3.4.

Tabla 3.4 – Clasificación del nivel de grasa visceral	
Nivel de grasa visceral	Clasificación del nivel
1-9	0 (Normal)
10-14	+ (Elevado)
15-30	++ (Muy elevado)
Según cifras recomendadas por <i>Omron Healthcare</i> .	

Con respecto a la medición del músculo esquelético se ha tenido en cuenta la edad y el sexo, clasificándose en normal o elevada según cifras recomendadas por *Omron Healthcare*.

Constantes vitales

La determinación de la presión arterial sistólica, diastólica y frecuencia cardiaca se ha realizado mediante el monitor de presión arterial digital automático modelo M3 (OMRON HEALTHCARE UK, LT, Kioto, Japón). Las mediciones se han realizado siguiendo las instrucciones del aparato entre las cuales se han incluido: que el sujeto se encuentre a una temperatura adecuada, relajado y sentado cómodamente y que el brazo permita colocar el manguito a la altura del corazón. El sujeto no debe comer, fumar, tomar cafeína, y no hacer ejercicio en los 30 minutos previos a realizar la medición. Las medidas se han realizado en el brazo izquierdo el voluntario. Para una medición más precisa se han realizado dos mediciones y posteriormente se ha calculado su media. En el caso de que entre las dos mediciones haya existido una diferencia de más de 5 mmHg, se ha procedido a realizar más medidas.

Los valores de referencia considerados para clasificar el estado de la presión arterial han sido los establecidos por la Sociedad Europea de Hipertensión (ESH) y la Sociedad Europea de cardiología (ESC), y presentados en la tabla 3.5. ²⁰²

Tabla 3.5 - Valores de referencia de tensión arterial marcados por la Sociedad Europea de Hipertensión (ESH) y la Sociedad Europea de Cardiología (ESC)		
Tensión Arterial Sistólica	Tensión Arterial Diastólica	Clasificación
120/129 mmHg	80/84 mmHg	Normal
130/139 mmHg	85/89 mmHg	Normal elevada
140/159 mmHg	90/99 mmHg	Grado I HTA
160/179 mmHg	100/109 mmHg	Grado II HTA
≥180 mmHg	≥100 mmHg	Grado III HTA
HTA, Hipertensión arterial. Fuente: ²⁰² .		

3.1.3.6 Estudio bioquímico

Los análisis bioquímicos se han llevado a cabo en el hospital Universitario La Paz para aquellos participantes que pudieron trasladarse. Para los participantes con dificultades de desplazamiento al hospital, la analítica se ha realizado en la visita de evaluación en IMDEA Alimentación, mediante el equipo *Reflotron® Plus de Roche Farma, S.A.*

En el hospital Universitario La Paz el análisis se ha realizado en sus laboratorios independientes siguiéndose los procedimientos estandarizados para ello.

El equipo *Reflotron® Plus* es un dispositivo de diagnóstico in vitro destinado a la determinación cuantitativa de parámetros de química clínica que utiliza porta-reactivos. Funciona según el principio de fotometría de reflexión y permite obtener resultados rápidos y fiables con manejo sencillo. Los parámetros medidos con este equipo han sido: colesterol total, colesterol HDL y triglicéridos.

Con estos tres parámetros se ha calculado el colesterol LDL mediante la fórmula de *Friedewald* que permite determinar la fracción LDL colesterol (LDLc) si conocemos el colesterol total (CT), la fracción HDL colesterol (HDLc) y los triglicéridos (TG). El cálculo se realiza según las siguientes formulas ²⁰³:

$$\text{LDLc} = \text{CT} - \left(\text{HDLc} + \frac{\text{TG}}{5} \right) \text{ en mg/dl, ó}$$

$$\text{LDLc} = \text{CT} - \left(\text{HDLc} + \frac{\text{TG}}{2.21} \right) \text{ expresados en mmol/L.}$$

La toma de muestra y determinaciones mediante el dispositivo *Reflotron Plus®* se han realizado del siguiente modo en el caso del colesterol total y triglicéridos: se ha limpiado el dedo del sujeto previamente con un algodón humedecido, se ha aplicado una lanceta BD

Microtainer® y se ha desechado la primera gota de sangre. A continuación, se ha llenado un capilar y se ha movido lentamente para favorecer la mezcla de anticoagulante (heparina). Posteriormente, se ha depositado el contenido del capilar en la zona de aplicación de la tira reactiva. En el caso de la determinación del HDL colesterol la sangre se ha recogido en un tubo *multivette*® 600 EDTA, se ha centrifugado durante 10 minutos en una mini-centrífuga 6000 rpm *Spectrafuge*™ y se ha depositado el plasma sobre la tira reactiva adecuada. Para asegurar la calidad de los resultados, se ha realizado un chequeo con *Reflotron clean and check* una vez a la semana.

Se han considerado los valores de referencia para clasificar valores normales o anormales en los parámetros bioquímicos del Hospital Universitario La Paz en 2011, así como los referenciados en Millán y cols. 2009²⁰⁴, como se muestran en la tabla 3.6.

Tabla 3.6 - Parámetros bioquímicos (X ± DT)		
	Valores Referencia	
	Hombres	Mujeres
Glucosa (mg/dl)	74 - 115 ¹	74 - 115 ¹
Colesterol total (CT) (mg/dl)	< 200 ¹	< 200 ¹
Colesterol HDL (mg/dl)	> 40 ¹	> 50 ¹
Colesterol LDL (mg/dl)	< 160 ¹	< 160 ¹
Triglicéridos (mg/dl)	< 150 ¹	< 150 ¹
Cociente CT/HDL	< 4.5 ²	< 4 ²
Cociente LDL/HDL	< 3 ²	< 2.5 ²
ASAT UI/l	< 31 ¹	< 31 ¹
ALAT UI/l	< 34 ¹	< 34 ¹
Uratos (mg/dl)	2.6 - 6.0 ¹	2.6 - 6.0 ¹
Creatinina (mg/dl)	0.7 - 1.1 ¹	0.7 - 1.1 ¹
Vitamina D (ng/ml)	15 - 100 ¹	15 - 100 ¹
APOA1 (mg/dl)	120 - 180 ¹	120 - 180 ¹
APOB (mg/dl)	63 - 110 ¹	63 - 110 ¹
Cociente APOB/APOA1	0.9 ²	0.8 ²
¹ Fuente: Valores de referencia Hospital Universitario La Paz, 2011		
² Fuente: ²⁰⁴		

3.1.4 CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA

3.1.4.1 Selección de variantes genéticas

Dado que el objetivo de la plataforma consiste en desarrollar distintos estudios en genómica nutricional, se han seleccionado polimorfismos para realizar una amplia caracterización. Por ello, se han elegido marcadores genéticos de tipo polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs),

implicados tanto en la metabolización de nutrientes como en las enfermedades nutricionales más prevalentes en nuestra sociedad (entendiendo como enfermedades nutricionales aquellas cuyo origen o evolución se ven condicionadas por la alimentación).

Para dicha selección se han tenido en cuenta los siguientes criterios:

- Estudio de rutas metabólicas y genes implicados en el metabolismo lipídico e inflamación.
- Estudio de genes y polimorfismos asociados a obesidad y enfermedades cardiovasculares.
- Localización en la secuencia y por tanto su influencia sobre el cambio de aminoácidos.
- Polimorfismos marcadores, *Tags*.
- Frecuencia alélica.
- Disponibilidad de sonda en *Applied Biosystems*®.

La selección de genes implicados en el metabolismo lipídico y relacionados con el proceso de inflamación, se ha realizado teniendo en cuenta la influencia de dichas rutas metabólicas sobre el estado de salud, ya que actúan como importantes precursores de lípidos moduladores de la señalización celular, la expresión génica y procesos inflamatorios. Para ello, se ha realizado una revisión sistemática de las vías metabólicas implicadas en el transporte, absorción y metabolismo de lípidos en los seres humanos. La revisión se ha llevado a cabo mediante la recopilación de información de la base de datos *BioCyc* (www.humancyc.org), *Universal Protein Resource: UniProt* (<http://www.uniprot.org/keywords/>), la base de datos *Reactome* (www.reactome.org) y la Enciclopedia de Kioto de genes y genomas (www.genome.jp/kegg/). A su vez, se ha realizado una revisión bibliográfica sobre genes involucrados en procesos inflamatorios y enfermedades cardiovasculares. La información de cada gen involucrado en el metabolismo de los ácidos grasos poliinsaturados en el *Homo sapiens*, ha sido tomada a través de la base de datos del Centro Nacional de Biotecnología (NCBI): (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/). La bibliografía disponible de la Biblioteca Nacional de Medicina de EE.UU. (*PubMed*): (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/) ha sido analizada con el fin de encontrar su implicación con enfermedades cardiovasculares.

Por otro lado, las variantes genéticas elegidas para elaborar el perfil genético de estudio, han sido estudiadas en la base de datos de genes humanos GENE CARD (www.genecard.org) así como en la base de datos de polimorfismos de un solo nucleótido, *db SNP (Short Genetic Variation)* del Centro Nacional de Biotecnología: NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/snp). En esta

última base de datos se ha completado la localización en la secuencia y por tanto su influencia sobre el cambio de aminoácidos de cada uno de los polimorfismos.

La herramienta que se ha utilizado para la selección de SNPs marcadores ha sido *Haploview 4.2* versión de 28 de abril de 2008, disponible en la página web del *Broad Institute* (www.broadinstitute.org/) y validada en diferentes estudios ²⁰⁵. Los parámetros elegidos en el programa han sido la población residente en Utah cuyos ancestros son europeos, CEUTSI (*Utah residents with Northern and Western European ancestry and Tuscan in Italy*) considerándose esta población más similar a la de nuestra región (versión 3; lanzamiento R2). Se ha utilizado el coeficiente de correlación por pares (r^2) seleccionando que cada SNP fuera marcado con un $r^2 > 0.8$ por alguno de los SNPs marcadores o por un haplotipo.

Para determinar si el alelo de frecuencia menor es detectable, se ha utilizado la ecuación del Equilibrio *Hardy-Weinberg*: $q^2 + 2qp + p^2 = 1$. Las frecuencias esperadas de cada genotipo se suponen q^2 , $2qp$ y p^2 , donde q y p representan las frecuencias de los alelos. Estos valores corresponden a la fracción de la población dada que se denomina homocigoto para el alelo menor (qq), heterocigoto (qp) y homocigoto (pp) respectivamente. Multiplicando el tamaño de la población de muestras a estudiar por la fracción de cada alelo, se ha determinado el número de individuos de cada genotipo que se debe esperar. Si la población es pequeña puede que los alelos raros no se detecten. De esta manera si el alelo con menor frecuencia ha sido de 0.19, tenemos un $q^2 = 0.0361$. Si multiplicamos 0.0361×297 muestras tenemos aproximadamente 10 individuos con el genotipo menor para su identificación, dato suficiente para la determinación. La base de datos que se ha utilizado para la obtener las frecuencias ha sido la base de datos pública del *International HapMap Project* (www.hapmap.org), concretamente la *HapMap Genome Browser* versión #28.

Por último, todos los SNPs incorporados han sido introducidos en el buscador de ensayos de *Applied Biosystem* (www.appliedbiosystems.com), para confirmar la existencia del ensayo y la posibilidad de ser utilizado en el equipo.

Dado que nuestra hipótesis de partida es que las características genéticas de los individuos determinan su respuesta al efecto de los componentes bioactivos de la dieta, así como su susceptibilidad a desarrollar enfermedades relacionadas con la nutrición (obesidad y enfermedades cardiovasculares), se han incluido 122 polimorfismos de un solo nucleótido en 52 genes clave relacionados con el desarrollo de dichas enfermedades, con la respuesta a dieta y procesos metabólicos asociados.

Selección de polimorfismos pertenecientes a genes relacionados con el desarrollo de obesidad

Se ha realizado una selección de genes y SNPs involucrados en la regulación del apetito dada su implicación sobre la homeostasis energética. Así, se han escogido SNPs de los genes que codifican neuropéptidos implicados en la regulación del apetito y gasto energético como el neuropéptido Y (NPY) y proopiomelanocortina (POMC), además de variantes del gen receptor de la melanocortina 4 (MC4R) que codifica un receptor acoplado a proteínas G involucrado en la señalización hipotalámica leptina-melanocortina.

Por otro lado, han sido seleccionados polimorfismos genéticos que codifican a hormonas que actúan sobre la regulación de estos neuropéptidos, tales como la grelina (GHRH) sintetizada principalmente en el estómago y que presenta niveles aumentados en estados de ayuno; el receptor de la leptina (LEPR), hormona sintetizada principalmente por los adipocitos con función anorexigénica; la adiponectina (ADIPOQ) que es una adipocina secretada por el tejido adiposo, cuyos niveles circulantes son inversamente proporcionales al índice de masa corporal (IMC) y el porcentaje de grasa corporal; el glucagón o péptido relacionado con el glucagón (GCG) que estimula los procesos catabólicos e inhibe los procesos anabólicos y que sugiere un efecto anorexigénico, y el péptido insulínico dependiente de glucosa o tradicionalmente denominado polipeptido inhibidor gástrico (GIP), hormona sintetizada en el intestino delgado liberada por la ingesta del consumo de grasas cuya función se piensa es inducir la secreción de insulina y también posee un efecto anorexigénico.

A su vez, también se han incorporado variantes del gen que codifica a la perilipina 1 (PLIN1), ya que se ha visto que juega un papel importante en el proceso de lipólisis regulando la acumulación o movilización de grasa en el tejido adiposo.

Puesto que actualmente se sabe que la ingesta energética y el gasto calórico no son los únicos factores que influyen en el desarrollo de la obesidad, se han seleccionado variantes genéticas que se han asociado directamente con dicha enfermedad. Entre ellas, se han incorporado polimorfismos del gen que codifica a la proteína asociada con la obesidad y masa grasa (FTO), y del gen que codifica a la proteína implicada en la regulación de los ritmos circadianos (CLOCK), ya que se ha visto que la regulación del ritmo circadiano juega un papel muy importante en la fisiología de la ingesta ²⁰⁶. También se han incluido SNPs del gen de periodo circadiano 2 (PER2), ya que varios estudios muestran que alteraciones en sus variantes genéticas están asociadas a obesidad ²⁰⁷.

Con el objetivo de estudiar otros procesos involucrados en la ganancia de peso, también se han estudiado SNPs del gen ADARB2, BRCA, MCM6 ya que referencias bibliográficas los asocian a sobrepeso y aumento de peso ^{208–210}. En el caso del gen MCM6, este se encuentra cerca del gen que codifica la lactasa (LCT) y que contiene regiones reguladoras de este gen, por lo que la variante genética seleccionada pertenece al gen que codifica a la lactasa.

En la tabla 3.7 se muestran los polimorfismos genéticos seleccionados, su funcionalidad y frecuencia alélica.

Tabla 3.7 - Selección de polimorfismos relacionadas con la obesidad					
	Símbolo	dbSNP id	Funcionalidad	Frecuencia Alélica*	
OBESIDAD	ADARB2	rs2805533	intron	G 0.487	A 0.513
	ADIPOQ	rs1501299	intron	G 0.721	T 0.279
		rs266729	near gene 5´	C 0.700	G 0.300
		rs17300539	nearGene-5	G 0.929	A 0.071
		rs2241766	cds-synon	ND	ND
		rs182052	intron	G 0.597	A 0.403
	BRCA2	rs144848	missense	A 0.677	C 0.323
	CLOCK	rs1801260	UTR 3´	A 0.739	G 0.261
		rs3749474	UTR-3	C 0.616	T 0.384
		rs4580704	intron	G 0.358	C 0.642
	FTO	rs9939609	intron	T 0.540	A 0.460
		rs8050136	intron	C 0.540	A 0.460
	GCG (GLP1)	rs4664447	intron	T 0.985	C 0.015
	GHRL	rs4684677	missense	T 0.892	A 0.108
		rs2075356	intron	T 0.885	C 0.115
	GIP	rs2291726	intron	T 0.549	C 0.451
	LCT (MCM6)	rs4988235	intron	G 0.270	A 0.730
	LEPR	rs8179183	missense	G 0.900	C 0.100
		rs1137100	missense	A 0.708	G 0.292
		rs1137101	missense	A 0.527	G 0.473
	MC4R	rs12970134	nd	G 0.721	A 0.279
	NPY	rs16147	near gene 5´	T 0.491	C 0.509
		rs5574	cds-synon	C 0.518	T 0.482
	PLIN1	rs1052700	UTR-3	A 0.654	T 0.346
	POMC	rs6713532	intron	T 0.774	C 0.226
		rs2071345	cds-synon	ND	ND
* Frecuencia Alélica, según base de datos HapMap Genome Browser versión #28. nd, dato no disponible.					

Selección de polimorfismos pertenecientes a genes relacionados con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares

Entre las variantes seleccionadas relacionadas con genes asociados a enfermedades cardiovasculares, se han incluido SNPs de genes involucrados en la función endotelial, coagulación sanguínea y la función vascular. Por ello, se han escogido variantes del gen que codifica el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1 o SERPINE1) que inhibe la fibrinólisis, eliminando de forma fisiológica los trombos de la sangre. También se han seleccionado variantes del gen que codifica el fibrinógeno (FGB), ya que es la proteína responsable en la formación de coágulos de sangre, además de mediar la adhesión celular y vasoconstricción y, por tanto, polimorfismos en este gen pueden ocasionar alteraciones sobre la coagulación. A su vez, se han añadido variantes del gen que codifica a la óxido nítrico sintasa u óxido nítrico sintasa endotelial (NOS-3 o eNOS), enzima que proporciona óxido nítrico en los vasos sanguíneos y está involucrada en la regulación de la función vascular.

Otro de los genes incluidos se encuentra dentro de los que codifican a la familia de los receptores de estrógenos (ESR), en concreto han sido seleccionadas variantes del ESR1 y el ESR2 que son factores de transcripción de receptores nucleares que regulan procesos responsables de importantes acciones cardiovasculares de los estrógenos, por ejemplo, la activación de la síntesis de óxido nítrico ^{211,212}.

Además, se han escogido polimorfismos genéticos de genes que codifican a moléculas relacionadas con las lipoproteínas y que influyen sobre el riesgo cardiovascular. Han sido añadidas, variantes del gen que codifica al receptor 1 de las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (ORL1 o LOX1) que se encarga de su degradación. También se han elegido polimorfismos del gen que codifica a la enzima paraoxonasa (PON1), proteína que está en el HDL y que posee un papel ateroprotector debido a su efecto antioxidante ²¹³.

Otro de los genes relacionado con el riesgo cardiovascular es el que codifica la metileno-tetrahidrofolato reductasa (MTHFR), enzima involucrada en el metabolismo del folato y que si se encuentra alterada afecta al metabolismo de la homocisteína. En concreto se ha encontrado asociada al SNP (C677T, Ala --> Val) una disminución de actividad enzimática, y por tanto, podría influir sobre el riesgo cardiovascular, ya que los niveles de homocisteína son considerados actualmente como un factor de riesgo cardiovascular ²¹⁴.

También, se ha incluido polimorfismos del gen que codifica la subunidad beta de la proteína G (GNB3), involucrado en la transducción de señales intracelulares entre los receptores y los

efectores en todas las células del cuerpo ²¹⁵. Está relacionado con variedad condiciones metabólicas como obesidad, enfermedades cardiovasculares e incluso insulinoresistencia ²¹⁶. Otro gen del que se han seleccionado polimorfismos es el gen que codifica a la proteína reguladora de la glucoquinasa (GCKR) , la cual regula la actividad de dicha enzima, involucrada en el metabolismo de los hidratos de carbono que modula la glucemia plasmática en ayunas, pudiendo interferir en la concentración plasmática de triglicéridos ²¹⁷.

Además de estos genes, también están relacionados con las enfermedades cardiovasculares una amplia variedad de genes que codifican enzimas del metabolismo lipídico como se ha visto en el correspondiente apartado.

El exceso de energía se almacena en los adipocitos, que aumentan en tamaño, en número o ambos, en especial los viscerales, produciendo un incremento en la tasa de lipólisis y estimulando la secreción de citoquinas por leucocitos, macrófagos y adipocitos, lo cual conduce a un estado proinflamatorio, resistencia a la insulina y disfunción endotelial, que puede ser el vínculo de unión entre la obesidad y la enfermedad cardiovascular. Así, la disfunción del tejido adiposo representa el mecanismo etiopatogénico en el desarrollo de enfermedad cardiovascular, iniciado por la obesidad visceral ⁷⁴. Por tanto, aunque se ha estratificado la selección por los procesos fundamentales en los que estos genes son determinantes, existe una amplia interconexión entre los distintos procesos que señala la potencial relevancia de estas variantes en la respuesta a una dieta diseñada para la promoción de la salud a través de la alimentación.

En la tabla 3.8 se muestran los polimorfismos genéticos seleccionados, su funcionalidad y frecuencia alélica.

Tabla 3.8 - Selección de polimorfismos relacionadas con enfermedades cardiovasculares					
	Símbolo	dbSNP id	Funcionalidad	Frecuencia Alélica*	
CARDIOVASCULAR	ESR1	rs2234693	<i>intron</i>	T 0.593	C 0.407
		rs9340799	<i>intron</i>	A 0.703	G 0.297
	ESR2	rs1256049	<i>cds-synon</i>	C 0.969	T 0.031
	FGB	rs4220 (8)	<i>missense</i>	G 0.808	A 0.192
		rs2227412	<i>intron</i>	A 0.881	G 0.119
		rs1044291	<i>3' utr</i>	C 0.668	T 0.332
	GCKR	rs780094	<i>intron</i>	T 0.394	C 0.606
	GNB3	rs2301339	<i>intron</i>	G 0.659	A 0.341
		rs5443	<i>cds-synon</i>	C 0.627	T 0.373
	MTHFR	rs6541003	<i>intron</i>	G 0.447	A 0.553
		rs4846048	<i>3' utr</i>	G 0.301	A 0.699

	rs1801131	<i>missense</i>	T 0.659	G 0.341
	rs1801133	<i>missense</i>	G 0.690	A 0.310
	rs4846052	<i>intron</i>	T 0.451	C 0.549
NOS3 (eNOS)	rs1799983	<i>missense</i>	T 0.346	G 0.654
ORL1/LOX-1	rs3736235	<i>intron</i>	T 0.482	C 0.518
PER2	rs4663302	<i>ND</i>	T 0.338	C 0.662
	rs2304672	<i>UTR 5</i>	G 0.894	C 0.106
	rs934945	<i>missense</i>	C 0.841	T 0.159
PON1	rs662	<i>missense</i>	T 0.668	C 0.332
SERPINE1 (PAI1)	rs6092	<i>missense</i>	G 0.892	A 0.108
* Frecuencia Alélica, según base de datos <i>HapMap Genome Browser</i> versión #28. ND, dato no disponible.				

Selección de polimorfismos pertenecientes a genes involucrados en el proceso inflamatorio

Teniendo en cuenta el posible papel que juega la respuesta inflamatoria sobre la relación entre el desarrollo de la obesidad y las enfermedades cardiovasculares, los polimorfismos pertenecientes a genes codificantes de proteínas involucradas en la respuesta inmune e inflamatoria pueden contribuir a explicar la variabilidad interindividual de los factores de riesgo cardiovascular en sujetos obesos.

Entre los genes estudiados para seleccionar variantes genéticas relacionadas con la inflamación se ha incluido el gen de la proteína C reactiva (CRP). Este gen codifica a la molécula cuyo nombre el gen indica, que aumenta sus niveles en respuesta a la inflamación y parece establecer una relación fuerte entre la inflamación, el tejido adiposo y enfermedad cardiovascular ²¹⁸.

Otro de los genes estudiados para seleccionar SNPs, ha sido el gen que codifica para la tiorredoxina lisosomal inducible por interferón gamma (IFI-30) ya que se ha visto que su expresión está aumentada en personas obesas con síndrome metabólico en comparación con las que no lo padecen ²¹⁹.

También se han escogido variantes del gen que codifica al inhibidor beta del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFKBIA). Este gen, involucrado en la respuesta inflamatoria, según algunos autores se podrían relacionar con los procesos inflamatorios que acontecen en la obesidad ²²⁰. A parte de esto, el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NFKB), es regulado por la

molécula que codifica el gen anteriormente citando, y es un factor de transcripción sensible a potencial *redox* que regula una cantidad de genes inflamatorios, y su activación genera la aparición de diversas sustancias, entre ellas las moléculas de adhesión de los leucocitos y citoquinas.

Además, también se han incorporado polimorfismos del gen que codifica la prostaglandina-endoperoxidase 2 (PTGS2), también denominada COX-2, ya que es una enzima del metabolismo lipídico cuyo sustrato es el ácido araquidónico, clave en la biosíntesis de las prostaglandinas y, por tanto, involucrada en procesos inflamatorios.

Por otro lado, se han incluido variantes genéticas que codifican a citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias ya que estas moléculas intervienen en la comunicación intercelular, así como en procesos de inflamación relacionados con el incremento de la masa del tejido adiposo y que influyen también a nivel cardiovascular ^{64,221}. En concreto se han escogido polimorfismos genéticos para las interleuquinas IL6, IL-4, IL-1 β y del gen del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α).

A su vez, también ha sido elegido el gen que codifica a la súper familia del receptor del factor de necrosis tumoral miembro 1A (TNFSF1A) ya que esta proteína es una de los principales receptores del TNF- α .

Finalmente, se han incluido SNPs que codifican a moléculas de adhesión, ya que, mediante la transmisión de señales al interior celular, modulan múltiples procesos entre los que se encuentran la formación de trombos y la migración y activación de los leucocitos generando la respuesta inflamatoria. Por tanto, el estudio de variantes genéticas del gen que codifica para estas moléculas, puede tener importancia a la hora de estudiar el componente genético de las enfermedades que cursan con inflamación como son las enfermedades cardiovasculares y obesidad. En concreto, se han elegido polimorfismos pertenecientes al gen de la selectina E (SELE) y del gen que codifica para la selectina P (SELP) ya que son moléculas transmisoras que inducen a procesos ateroscleróticos y parecen estar involucrados en la fisiopatología de la obesidad ^{222,223}.

En la tabla 3.9 se muestran las variantes genéticas seleccionadas, su funcionalidad y frecuencia alélica.

Tabla 3.9 - Selección de polimorfismos relacionados con la inflamación				
	Símbolo	dbSNP id	Funcionalidad	Frecuencia Alélica*
INFLAMACIÓN	CRP	rs1130864	UTR 3'	G 0.695 A 0.305
		rs1800947	<i>cds-synon</i>	C 0.931 G 0.069
	IFI30	rs11554159	<i>missense</i>	G 0.726 A 0.274
	IL4	rs2243250	5' near gene	C 0.863 T 0.137
		rs2227282	<i>intron</i>	C 0.265 G 0.735
	IL6	rs1800797	<i>near gene 5'</i>	A 0.527 G 0.473
	ILB1	rs1143623	<i>nearGene-5</i>	C 0.667 G 0.333
	NFKBIA	rs8904	3' utr	G 0.612 A 0.388
		rs2233406	5' near gene	G 0.699 A 0.301
	PTGS2	rs2066826	<i>intron</i>	C 0.850 T 0.150
		rs689466	5' near gene	T 0.832 C 0.168
	SELE	rs5359	3' utr	T 0.898 C 0.102
		rs5368	<i>missense</i>	G 0.920 A 0.080
		rs4786	3' utr	T 0.761 C 0.239
	SELP	rs6128	<i>cds-synon</i>	A 0.372 G 0.628
		rs6131	<i>missense</i>	C 0.779 T 0.221
		rs2205895	<i>intron</i>	C 0.646 T 0.354
		rs3917683	<i>intron</i>	T 0.407 C 0.593
		rs6133	<i>missense</i>	C 0.884 A 0.116
	TNF – α	rs1800629	<i>near gene 5'</i>	G 0.827 A 0.173
		rs1799724	<i>nearGene-5</i>	C 0.850 A 0.150
	TNFRSF1A	rs767455	<i>cds-synon</i>	T 0.485 C 0.515
* Frecuencia Alélica, según base de datos HapMap Genome Browser versión #28.				

Selección de polimorfismos pertenecientes a genes involucrados en el metabolismo lipídico

Dada la importancia del metabolismo lipídico en el procesamiento de nutrientes, así como su implicación en un gran número de desórdenes relacionados con enfermedades nutricionales, se ha realizado un estudio bibliográfico de las principales rutas metabólicas y de los pasos clave de interconexión entre ellas para incluir los genes esenciales que regulan estos procesos en la caracterización genotípica de la población y poder estratificar genéticamente a la población según su perfil metabólico. Para ello, se han seleccionado polimorfismos de genes que codifican a moléculas que participan en el transporte de lípidos, degradación de grasas, metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados y de detoxificación celular (peroxisomas).

Entre los genes incorporados se encuentra un número elevado de regiones que codifican a las apolipoproteínas, ya que como su propio nombre indica, son moléculas de naturaleza proteica

que se encargan del transporte de lípidos a través del torrente sanguíneo. Estas moléculas juegan un papel fundamental en el metabolismo lipídico y alteraciones de las mismas están asociadas con diferentes patologías relacionadas con la nutrición.

Se han escogido polimorfismos del gen que codifica para la apolipoproteína B (APOB), y apolipoproteína E (APOE) ya que son moléculas que interaccionan con el receptor de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). En concreto, la apolipoproteína B codificada por el gen APOB es la principal proteína que está involucrada en el transporte de colesterol LDL por lo que variaciones en la apolipoproteína B pueden provocar alteraciones causando hipercolesterolemia ²²⁴. A su vez, la apolipoproteína E, principal componente de los quilomicrones, está codificada por el gen APOE y alteraciones en dicho gen se han asociado a aterosclerosis, enfermedad de Alzheimer y desarrollo cognitivo inadecuado ²²⁵.

Otros SNPs seleccionados debido a su implicación en el transporte celular del colesterol y regulación de fosfolípidos de membrana, pertenecen a gen transportador dependiente de la unión de ATP (ABCA1) ²²⁶. También se han seleccionado variantes genéticas del gen que codifica a la proteína citosólica fosfolipasa A2 (PLA2G4B), debido a su función de hidrólisis de fosfolípidos y liberadora de ácidos grasos. Igualmente, se ha incluido el polimorfismo genético perteneciente al gen que codifica a la proteína de membrana que actúa de receptor de las lipoproteínas de alta densidad HDL (SCARB1) ²²⁷. A su vez, también se han incorporado variantes genéticas de los genes lipasa hepática C (LIPC) y la lipoproteína lipasa (LPL), ya que codifican a enzimas involucradas en la degradación de grasas y en el caso de la LPL en la hidrólisis de triglicéridos de los quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad, liberando ácidos grasos libres al músculo y tejido adiposo ²²⁸.

Dentro de las vías del metabolismo lipídico, cabe resaltar la del metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (ácido linolénico) y omega-6 (ácido linoleico) debido a su implicación con procesos inflamatorios y sobre procesos cardiovasculares. Estos ácidos grasos son precursores de ácidos grasos de cadena larga, el ácido araquidónico y el ácido docohexanoico, que son constituidos mediante elongación y desaturación llevada a cabo por desaturasas 1 y 2 (FADS-1 y FADS-2), codificadas por genes pertenecientes a la familia de enzimas desaturasas ^{229,230}. Además, se han seleccionado variantes genéticas pertenecientes a genes que codifican a la araquidonato 5-lipoxigenasa (ALOX-5), enzima que, junto a la prostaglandina-endoperoxidasa sintasa 2 seleccionada en el apartado anterior de inflamación, juegan un papel esencial en la producción de mediadores inflamatorios como prostaglandinas, tromboxanos, prostaciclina, y leucotrienos.

Se han añadido polimorfismos genéticos pertenecientes a los genes receptores activadores de la proliferación de peroxisomas (PPARA y PPARG) relacionados con la actividad de enzimas responsables de la oxidación de ácidos grasos y que juegan un papel importante en la regulación del metabolismo lipídico, gluconeogénesis y termogénesis, así como sobre la producción de citoquinas involucradas en el proceso inflamatorio y en el control del crecimiento y diferenciación celular ²³¹.

También se han incorporado variantes genéticas del gen que codifica a la 3-hidroxi-3-methylglutaril-coA reductasa (HMGCR), la cual cataliza el paso de biosíntesis de colesterol limitando la velocidad de reacción y constituye un mecanismo de control de los niveles de colesterol en sangre ²³².

Por otro lado, se han seleccionado SNPs de los genes que codifican a proteínas de unión a elementos de respuesta a esteroides (SREBF1 y SREBF2) que regulan la homeostasis lipídica del organismo controlando la expresión de numerosas enzimas implicadas en la síntesis de colesterol, ácidos grasos, triglicéridos y fosfolípidos ²³³.

En la tabla 3.10 se muestran las variantes genéticas seleccionadas, su funcionalidad y frecuencia alélica.

Tabla 3.10 - Selección de polimorfismos relacionadas con el metabolismo lipídico					
	Símbolo	dbSNP id	Funcionalidad	Frecuencia Alélica*	
METABOLISMO LIPÍDICO	ABCA1	rs2575875	<i>intron</i>	G 0.708	A 0.292
		rs4149272	<i>intron</i>	C 0.746	T 0.254
		rs2230806	<i>missense</i>	C 0.790	T 0.210
	ALOX5	rs2099171	<i>intron</i>	C 0.385	T 0.615
		rs7068039	<i>intron</i>	T 0.795	C 0.205
		rs3780909	<i>intron</i>	T 0.562	A 0.438
		rs7913948	<i>5' near gene</i>	A 0.19	G 9.81
	APOB	rs676210	<i>missense</i>	G 0.796	A 0.204
		rs10199768	<i>intron</i>	G 0.540	T 0.460
		rs520354	<i>intron</i>	A 0.549	G 0.451
		rs1367117	<i>missense</i>	G 0.665	A 0.335
		rs1042031	<i>missense</i>	C 0.797	T 0.203
		rs533617	<i>missense</i>	T 0.951	C 0.049
		rs693	<i>cds-synon</i>	G 0.509	A 0.491
		rs12713956	<i>intron</i>	A 0.898	G 0.102
		rs512535	<i>5' near gene</i>	T 0.522	C 0.478
	APOE	rs429358	<i>missense</i>	ND	ND
		rs7412	<i>missense</i>	ND	ND
		rs405509	<i>5' near gene</i>	T 0.509	G 0.491

FABP2	rs1799883	<i>missense</i>	T 0.327	C 0.673
FADS1	rs174549	<i>intron</i>	G 0.704	A 0.296
	rs174546	<i>3' utr</i>	C 0.659	T 0.341
FADS2	rs174568	<i>5' near gene</i>	C 0.659	T 0.341
	rs174616	<i>intron</i>	G 0.562	A 0.438
	rs498793	<i>intron</i>	T 0.394	C 0.606
	rs174579	<i>intron</i>	C 0.765	T 0.235
HMGCR	rs12916	<i>3' utr</i>	T 0.597	C 0.403
	rs3761738	<i>5' near gene</i>	C 0.876	T 0.124
	rs3761739	<i>5' near gene</i>	C 0.827	T 0.173
LIPC	rs1800588	<i>nearGene-5</i>	C 0.746	T 0.254
LPL	rs328	<i>stop-gain</i>	C 0.869	G 0.131
PLA2G4B	rs3816533	<i>missense</i>	C 0.826	T 0.174
	rs16972136	<i>intron</i>	C 0.832	T 0.168
	rs2305654	<i>intron</i>	C 0.650	A 0.350
	rs1197669	<i>mutación silenciosa</i>	G 0.673	A 0.327
	rs1197668	<i>3' near gene</i>	G 0.513	A 0.487
PPARA	rs6008259	<i>3' utr</i>	G 0.801	A 0.199
	rs9626814	<i>3' utr</i>	G 0.863	A 0.137
	rs5766743	<i>intron</i>	A 0.743	G 0.257
	rs135551	<i>intron</i>	A 0.265	G 0.735
	rs1042311	<i>missense</i>	C 0.995	T 0.005
	rs135549	<i>intron</i>	C 0.393	T 0.607
PPARG	rs3856806	<i>cds-synon</i>	C 0.879	T 0.121
	rs1801282	<i>missense</i>	C 0.903	G 0.097
SCARB1	rs4238001	<i>missense</i>	ND	ND
SREBF1	rs9902941	<i>intron</i>	C 0.305	T 0.695
	rs11868035	<i>3' utr</i>	G 0.719	A 0.281
SREBF2	rs1052717	<i>intron</i>	A 0.527	G 0.473
	rs1883205	<i>intron</i>	T 0.243	C 0.757
	rs2255957	<i>intron</i>	G 0.850	A 0.150
	rs2267443	<i>intron</i>	A 0.394	G 0.606
	rs9607850	<i>intron</i>	C 0.500	T 0.500
	rs2229442	<i>3' utr</i>	A 0.907	G 0.093
* Frecuencia Alélica, según base de datos HapMap Genome Browser versión #28. ND, dato no disponible.				

En la figura 3.3 se muestra el conjunto de los genes seleccionados para esta tesis, en función de su implicación en las diferentes rutas metabólicas.

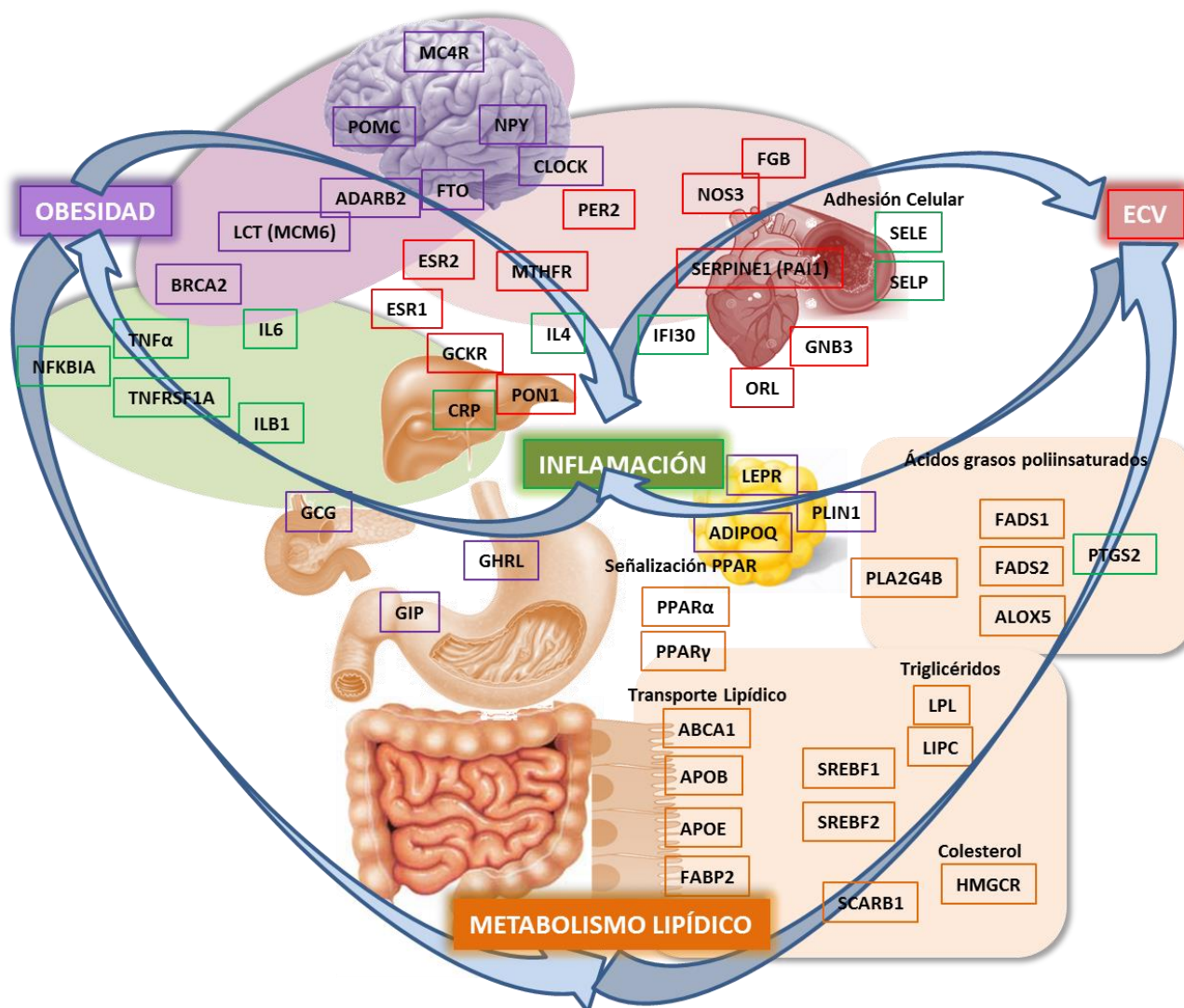


Figura 3.3– Compendio de genes seleccionados involucrados e interconectados con la obesidad, enfermedades cardiovasculares, inflamación y metabolismo lipídico.

Obesidad: MC4R, POMC, NPY, ADARB2, FTO, CLOCK, MCM6, BRCA2, GCG, GIP, GHRL, ADIPOQ, LEPR, PLIN1.
 Enfermedades cardiovasculares: FGB, NOS3, SERPINE1, GNB3, ORL, MTHFR, PER2, ESR1, ESR2, GSKR, PON1.
 Inflamación: CRP, IL4, IL6, ILB1, TNF α , TNFRSF1A, NFKBIA, SELE, SELP, PTGS2. Metabolismo lipídico: ABCA1, APOB, APOE, FABP2, PPAR α , PPAR γ , SREBF1, SREBF2, SCARB1, HMGCR, LPL, LIPC, FADS1, FADS2, ALOX5, PLA2G4B.

La caracterización genotípica se ha realizado con 64 variantes, de las previamente seleccionadas en los apartados anteriores. Para ello se han escogido los polimorfismos considerados más relevantes de cada uno de los apartados anteriores.

3.1.4.2 Obtención de muestras para genotipado

La toma de muestras se ha llevado a cabo en IMDEA Alimentación. Se ha procedido a tomar una muestra de raspado bucal y de sangre capilar de cada participante. Para ello se han probado previamente diferentes métodos de obtención en cada caso.

Para la obtención de muestra de raspado bucal se han mejorado, como se muestra en la figura 3.4, los siguientes métodos para su puesta a punto: escobillones en tubo estériles CE clase IIa (MDD) poliestireno rompible y algodón en tubo, hisopos bucales para ADN *Isohelix*, colector de saliva para la estabilización de ADN *STRATEC Molecular Isogen* y el kit de recolección de ADN *Oragene* ADN (OG-500).



Figura 3.4- Diferentes métodos de recogida de raspado bucal o saliva. Catálogo *Deltalab Eurotubo* 2011.
<http://www.isohelix.com/products/isohelix-dna-buccal-swabs/>. *Oragene* DNA (OG-500)
<http://www.dnagenotek.com/ROW/products/OG500.html>

La obtención definitiva de las muestras bucales se ha realizado mediante escobillones en tubo estériles CE clase IIa (MDD) poliestireno rompible y algodón, introduciendo el bastoncillo en la boca y con la parte que tiene el algodón, frotando vigorosamente en cada lado de la mejilla varias veces (aproximadamente 30 segundos por lado). De esta forma las células de la mucosa bucal quedan adheridas al algodón. Posteriormente se ha guardado en un tubo *Eppendorf* esterilizado, se ha etiquetado con el código generado por la base de datos con una rotuladora de etiquetas (PT-2430PC *Brother* Iberia), y se ha dejado secar durante 24 horas. Pasado ese tiempo se ha realizado la extracción de ADN.

Para la obtención de muestra de sangre capilar se ha ensayado con tarjetas *Whatman FTA™ Healthcare*, mostradas en la figura 3.5. Se trata de una tecnología diseñada para la recogida de muestras sobre una matriz FTA (*fast technology for analysis*) que está impregnada con una fórmula química patentada que lisa las membranas celulares y desnaturaliza las proteínas por contacto y permite conservar la muestra a temperatura ambiente y su posterior aislamiento de ácidos nucleicos.

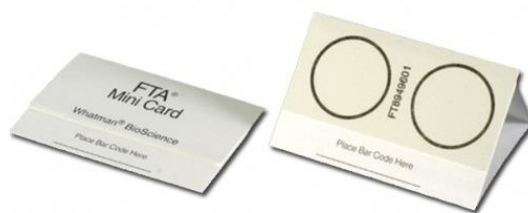


Figura 3.5- Whatman Tarjetas FTA GE Healthcare.
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/z719781?lang=es®ion=ES>

A continuación se han probado otros sistemas de recolección: *BD Microtainer™*, *microvette® CB 300* y *multivette® 600 EDTA*; y diferentes tipos de lancetas: de seguridad *SARSTEDT AG & Co.*, *Accu-chek Safe T pro*, *Unistick Lanceta BD Microtainer®*. Sus características se presentan en la tabla 3.11.

Tabla 3.11 - Tipos de lancetas probadas		
Lanceta	Grosor (mm)	Profundidad (mm)
<i>SARSTEDT Super</i>	1.5	1.6
<i>Accu-chek Safe T pro</i>	0.36	1.5
<i>Unistick Neonatal</i>	1.20	1.8
<i>BD Microtainer®</i>	1.50	2.0

La obtención definitiva de las muestras de sangre capilar se ha llevado a cabo, como se puede ver en la figura 3.6, mediante tubos *multivette® 600 EDTA* (*SARSTEDT AG & Co.*) para recogida de muestras. La extracción se ha realizado aplicando una punción en el dedo con lancetas automáticas desechables (Lanceta *BD Microtainer®* color azul. *BD Diagnostics*. Madrid). Una vez recogida la sangre se han realizado ligeros movimientos para evitar la coagulación de la sangre. En las tomas de muestra se ha procedido a la desinfección de la herida y la colocación del apósito. El volumen de sangre obtenido ha sido de 300µl a 500µl.



Figura 3.6 - Obtención de sangre capilar.
<http://www.elk-spb.ru/catalogue/?id=1&lev=1&view=156>

Posteriormente, la sangre se ha etiquetado con el código generado por la base de datos con una rotuladora de etiquetas (*PT-2430PC Brother Iberia*), y se ha almacenado en un congelador de -80°C.

3.1.4.3 *Procesado de muestras para genotipado*

Para el posterior análisis de genotipado se ha procedido a extraer el ADN genómico de las muestras de raspado bucal y muestras sangre total. Ambas extracciones se han realizado mediante el empleo de kits de extracción manual.

Para optimizar el protocolo de extracción de ADN a partir de raspado bucal se han probado diferentes kits de extracción. Se han tenido en cuenta algunas variantes como el tipo de bastoncillo utilizado, el tiempo de secado de la muestra, o la reducción el volumen de elución de la muestra en aquellos kits que lo han permitido:

- *Kit Invisorb Spin Tissue Mini kit (Stratec Biomedical AG)* con las siguientes condiciones: secado a temperatura ambiente de las muestras durante 23 horas. Elución en 75µl (en lugar de 100µl, para concentrar más) del *buffer D* del kit.
- *Kit Invisorb Spin Swab (Stratec Biomedical AG)* con las siguientes condiciones de extracción: secado de la muestra durante 2h 50min; elución en 50µl del *buffer D* del kit.
- *Kit Invisorb Forensic I (Stratec Biomedical AG)* con las siguientes condiciones de extracción: secado de las muestras durante 8h. Lisis de 15 horas. Elución en 60µl del *buffer D* del kit.
- *DNA Isolation Kit DDK-3 (Isohelix, Cellprojects)* con las siguientes condiciones de extracción: los *pellets* de DNA se pusieron a secar 20 minutos a 60°C antes de resuspender en 70µl de H₂O libre de nucleasas.
- *Kit SpeedTools DNA Extracion kit (Biotools, B & M Labs, S.A)* con las siguientes condiciones de extracción: paso de lisis mediante incubación a 70°C durante 15 minutos. Etanol añadido a la muestra: absoluto. Elución: 2 eluciones seguidas de 50µl de *buffer BBE* cada una.

La calidad y concentración han sido medidas mediante el equipo de espectrofotometría *nanodrop ND-2000 UV-Vis (Thermo Fisher Scientific Inc. EE.UU.)*. Se ha comprobado que la calidad de la concentración de las muestras y la calidad de las mismas se aproxime a 50 ng/µl y tengan una absorbancia de 260/280 y 260/230 con ratios mayores a 1.7 ya que los son los requerimientos recomendados para el análisis empleando la Plataforma de genotipado *Quantstudio™ PCR* a tiempo real.

Después de las pruebas realizadas se ha decidido el uso del kit *Invisorb Spin Tissue Mini kit* (Strattec Biomedical AG) por ser el que más se ha aproximado a las condiciones óptimas anteriormente citadas, además de su coste y simplicidad de procedimiento.

En el caso de la extracción de ADN a partir de sangre total, se ha utilizado el kit *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (QIAGEN, España) ya que ha ofrecido buena calidad. Se trata de un sistema que utiliza la tecnología de membrana de gel de sílice (tecnología *QIAamp*) para el aislamiento y la purificación de ADN genómico procedente de muestras biológicas. El procedimiento utilizado, se ha basado en el protocolo indicado por la casa comercial, se ha optimizado para la determinación más eficiente en la plataforma de genotipado de alto rendimiento *Quantstudio™* PCR a tiempo real (*Applied Biosystems®*). Para su puesta a punto y optimización se han probado diferentes cantidades de sangre (200µl y 300µl) y volúmenes de elución (200 µl, 100 µl y 50 µl) y se ha utilizado el kit *DNA Clean & Concentrator™ -5* (Zymo Reseracrh Corp.) para la concentración de muestra donde se ha partido de 75 µl de ADN y ha eluido a 7.5 µl. Una vez optimizado, se ha partido de 300 µl de sangre total y el ADN se ha extraído en 100 µl de agua libre de nucleasas ya que con este método la mayoría de las muestras han alcanzado los requisitos necesarios. Se ha utilizado etanol al 100 % en el proceso de extracción.

Al igual que en el caso de las muestras de raspado bucal, la calidad y concentración han sido medidas mediante el equipo de espectrofotometría *nanodrop ND-2000 UV-Vis* (*Thermo Fisher Scientific Inc.* EE.UU.). Igualmente, se ha comprobado que se acercan a las condiciones requeridas para el análisis empleando la Plataforma de genotipado *Quantstudio™* PCR a tiempo real.

3.1.4.4 Genotipado de las muestras

El análisis genético de las variantes seleccionadas se ha llevado a cabo mediante discriminación alélica realizando análisis de fluorescencia con sondas *TaqMan®*. Esta técnica se ha realizado sobre la siguiente plataforma: *Quantstudio™* PCR a tiempo real (*Applied Biosystems®*)

Las sondas *TaqMan®*, como se puede ver en la figura 3.7, son oligonucleótidos marcados mediante dos fluorocromos en sus extremos que miden los productos de la reacción en cadena de la polimerasa. En el extremo 5' se encuentra un fluorocromo o "reporter" (VIC® para un alelo y FAM™ para el otro alelo) y en el extremo 3' la molécula denominada quencher. Cuando la sonda está intacta, la cercanía entre el fluorocromo y el *quencher* no permite la emisión de fluorescencia ya que es absorbida por este mediante el proceso de transferencia de

energía de resonancia de *Förster* o transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET)²³⁴. Sin embargo, cuando la sonda hibrida con la secuencia de ADN y la polimerasa comienza a copiar la secuencia, se produce la degradación de la sonda, se separan las moléculas y entonces se emite fluorescencia. A medida que se repiten los ciclos de reacción en cadena de la polimerasa, aumenta la intensidad de la fluorescencia que es proporcional a la cantidad de producto generado.



Figura 3.7 - Funcionamiento de las sondas *TaqMan*.

1. Sondas no unidas a la secuencia de ADN. 2. Unión de sonda a secuencia de ADN. 3. Degradación de la sonda debido a la actividad exonucleasa de la polimerasa.

TaqMan Probes». Publicado bajo la licencia *Creative Commons Attribution-Share Alike*.

http://commons.wikimedia.org/wiki/File:TaqMan_Probes.jpg#mediaviewer/File:TaqMan_Probes.jpg.

El genotipado de la población se ha realizado utilizando la plataforma *QuantStudio™ 12K Flex Flex Real-Time PCR*, con el bloque de *OpenArray™* y el sistema *Accufill™* para el cargado automático de muestras en el chip.

La plataforma *QuantStudio™ 12K Flex Flex Real-Time PCR*, constituye un equipo altamente flexible que además de análisis de genotipado permite la realización de análisis de expresión genética, microARN y pequeños ARNs no codificantes, el análisis de proteínas, análisis de alta resolución de fusión (HRM), variación del número de copias (CNV), así como para la detección de patógenos.

Para el análisis genético en esta plataforma se han utilizado chips de genotipado *TaqMan® OpenArray®*. Cada chip está formado por 48 celdas que están formadas a su vez por 64 pocillos. Cada uno de estos pocillos contiene dos cebadores de la reacción de amplificación así como dos sondas *TaqMan®* específicas para cada uno de los alelos (nombradas como VIC® y FAM™) del polimorfismo elegido. El formato utilizado para este proyecto se puede ver en la figura 3.8, y ha sido el de 64 x 48 en el que cada celda contiene 64 polimorfismos de un solo nucleótido y analiza una sola muestra.

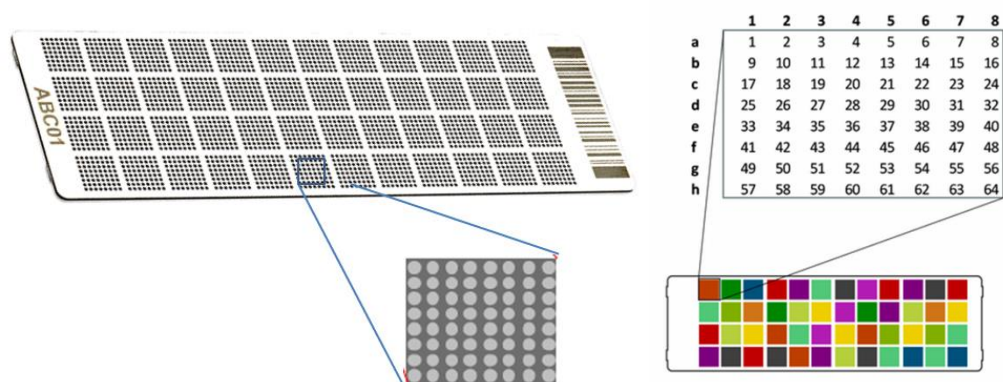


Figura 3.8 - Chip *TaqMan® OpenArray®* y formato empleado para el proyecto.

<http://www.appliedbiosystems.com>

Las muestras de ADN, 2.5 µl con una concentración de 50 ng/µl o menor (entre un rango de 9.2 a 50 ng/µl), se han cargado en placas de 384 pocillos *TaqMan® OpenArray®* junto con 2.5 µl de *TaqMan OpenArray Master Mix 2 x*. La carga del chip se ha realizado con el equipo automático *QuantStudio™ 12K Flex Accufill Applied Biosystems™* y el sellado del mismo con el *QuantStudio™ 12K Flex OpenArray™ Plate Press 2.0*. La amplificación mediante PCR se ha realizado en el termociclador *GeneAmp® PCR System 9700 Dual Flat Block* durante 4 horas según el protocolo indicando por *Applied Biosystems*.

Para poner a punto esta plataforma se han realizado pruebas con muestras de ADN con diferentes concentraciones y ratios, incluyendo muestras que no han cumplido los requisitos para comprobar si amplificaban igualmente ²³⁵. En la figura 3.9 se muestra un ejemplo de análisis realizado.

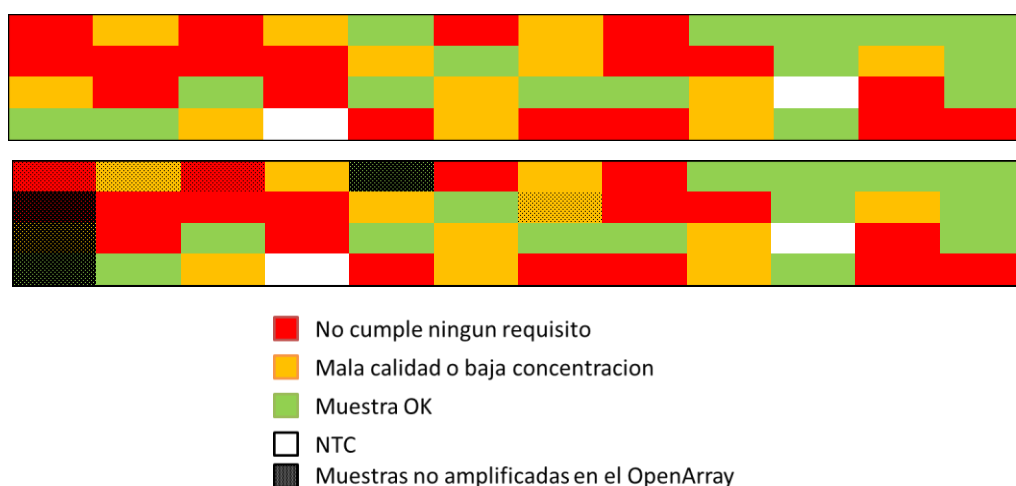


Figura 3.9 - Representación de un chip con diferentes concentraciones de ADN.

Se han añadido dos blancos por cada chip y se han realizado análisis de reproducibilidad incluyendo un 10 % de muestras de repetición obteniendo un 99 % de reproducibilidad con la técnica utilizada.

Para el análisis de datos se ha utilizado el software *TaqMan® Genotyper v1.0.1*, mostrado en la figura 3.10, el cual usa un algoritmo de análisis más perfeccionado que el *TaqMan OpenArray Genotyping Software*. El porcentaje de calidad considerado ha sido igual o superior al 90 %. Para el cálculo de este parámetro de calidad, se han tenido en cuenta los controles fallidos (0.95 u), la baja calidad de genotipado (1000 u), la baja intensidad de señal de fondo (4000 u) así como la detección de señal de controles negativos (3000 u). Se ha utilizado el método de señalización *Autocalling*.

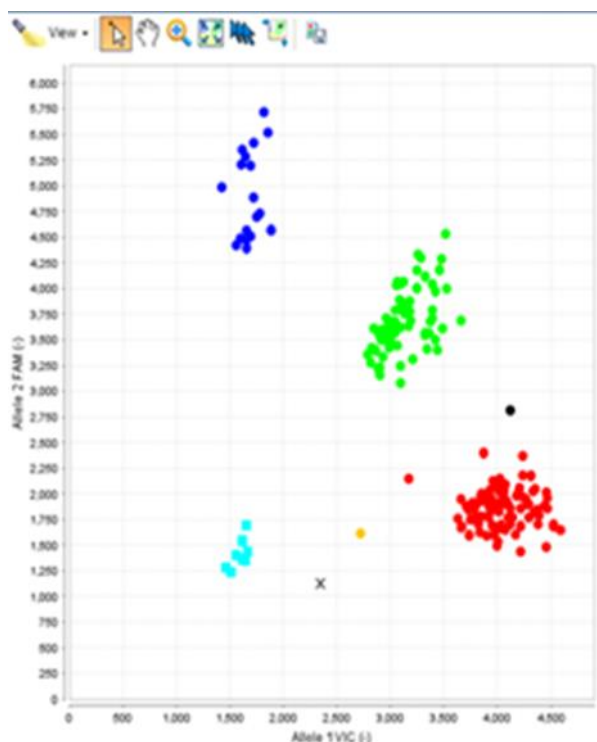


Figura 3.10 - Representación del resultado de genotipado de un SNP en el software *TaqMan® Genotyper v1.0.1*. La discriminación alélica por fluorescencia permite detectar el genotipo de cada sujeto (alelo 1 homocigoto, alelo 2 homocigoto y heterocigoto).

3.1.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos fenotípicos y genotípicos han sido recopilados de los diferentes cuestionarios y software de análisis, en tablas que posteriormente han sido revisadas habiéndose subsanado posibles errores de escritura de los datos (depuradas).

El análisis se ha llevado a cabo con el programa informático software de estadística “R” versión 3.2.3 en el departamento de estadística de IMDEA Alimentación.

3.1.5.1 *Análisis descriptivo de los datos fenotípicos*

Para describir la muestra de la población estudio se han empleado estadísticos descriptivos. En el caso de las variables continuas, estas se han descrito mediante medias y desviaciones típicas (DT). En el caso de las variables categóricas, estas se han descrito mediante porcentajes (%).

La evaluación de la diferencia en las diferentes variables entre hombres y mujeres ha sido analizada mediante modelo de regresión lineal múltiple en el caso de que la variable respuesta haya sido continua, y el modelo de regresión logística múltiple en el caso de que la variable respuesta haya sido binaria. Se han llevado a cabo estos modelos debido a que se han ajustado por la edad, como variable de confusión. Además, en el caso de la presión arterial sistólica y diastólica también se ha ajustado por diámetro de cintura.

Se han considerado las asociaciones estadísticamente significativas cuando el p valor ha resultado inferior de 0.05

3.1.5.2 *Análisis descriptivo de los datos genéticos*

Con el objetivo de describir los resultados de los datos genéticos se han determinado la frecuencias por genotipos y por alelos, realizado el análisis de equilibrio de *Hardy-Weinberg* para cada variante genética, así como la existencia de desequilibrio de ligamiento.

Las frecuencias de los tres genotipos han sido determinadas mediante contaje. Puesto que los polimorfismos genéticos analizados pertenecen a cromosomas autosómicos, cada sujeto posee dos alelos, y cada uno perteneciente a cada copia del cromosoma, los cuales se han transmitido del padre y de la madre de manera independiente. Así, teniendo en cuenta el alelo 1 y del alelo 2, surgen tres posibilidades de combinaciones y por tanto tres tipos de genotipos posibles: alelo 1 más alelo 1, que en caso de ser este alelo más frecuente se ha considerado el genotipo homocigoto común; el alelo 1 más el alelo 2, en cuyo caso se ha denominado genotipo heterocigoto; y el alelo 2 más el alelo 2, que en caso de ser este el alelo menos frecuente se ha considerado el genotipo homocigoto variante ¹⁷⁰.

Las frecuencias alélicas se han estimado mediante el recuento de los genotipos teniendo en cuenta las siguientes fórmulas:

$$\text{Frecuencia alélica del alelo mayoritario} = \frac{2 \times \text{Homocigoto Común} + \text{Heterocigoto}}{2 \times \text{Tamaño muestral}}$$

$$\text{Frecuencia alélica del alelo minoritario} = \frac{2 \times \text{Homocigoto Variante} + \text{Heterocigoto}}{2 \times \text{Tamaño muestral}}$$

Las frecuencias genotípicas y alélicas se han expresado en porcentajes (genotipo/tamaño total de la muestra*100).

Con el objetivo de determinar si la muestra pertenece a una población lo suficientemente significativa, sin selección, mutación o migración genética y por tanto, que la transferencia haya sucedido al azar y de manera aleatoria, se ha determinado, mediante el uso de las frecuencias analizadas, el equilibrio de *Hardy-Weinberg* para cada variante genética, mediante el test de *chi-cuadrado* con un grado de libertad. Si se considera un locus con dos alelos “1” y “2” los cuales se heredan de forma independiente, el número de copias del alelo “1” sigue una distribución binomial. En el caso en el que el número de heterocigotos y homocigotos variantes ha sido muy reducido y por tanto el *p* valor no ha sido representativo, este ha sido calculado mediante un test exacto. Se ha considerado equilibrio cuando el *p* valor ha resultado superior a 0.05.

Para determinar si los polimorfismos seleccionados se encuentran en determinado grado de correlación se ha llevado a cabo el análisis de desequilibrio de ligamiento, que se ha calculado mediante el coeficiente de correlación de Pearson al cuadrado. El desequilibrio de ligamiento se produce cuando la asociación no se ha debido al azar. Esto sucede cuando los polimorfismos se encuentran localizados en el mismo cromosoma y a su vez están relativamente próximos entre sí ^{170,236}. Se ha considerado desequilibrio de ligamiento cuando el resultado de la correlación al cuadrado ha sido superior a 0.7.

3.2 ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN FENOTIPO Y GENOTIPO DE LA POBLACIÓN DE LA PLATAFORMA CANTOBLANCO

Una vez realizada la caracterización fenotípica y genotípica de la Plataforma Cantoblanco, se ha procedido a analizar la posible asociación entre dichos datos, con el objetivo de relacionar los estilos de vida y el estado nutricional de la población con las variantes genéticas seleccionadas.

A su vez, se han estudiado interacciones entre polimorfismos y estilos de vida (dieta, actividad física, etc.) con respecto a los parámetros antropométricos, con el fin de establecer posibles aplicaciones nutrigenéticas y mejorar el conocimiento científico.

3.2.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis genético de los polimorfismos se ha realizado teniendo en cuenta los dos alelos, pertenecientes a cada uno de los progenitores, y se han clasificado como homocigotos para las dos copias del alelo mayoritario, heterocigotos para los portadores con los alelos diferentes, y homocigotos comunes para las dos copias de alelo minoritario.

La evaluación de la diferencia en las diferentes variables entre genotipos ha sido analizada mediante modelo de regresión lineal múltiple en el caso de que la variable respuesta haya sido continua, y el modelo de regresión logística múltiple en el caso de que la variable respuesta haya sido binaria. Todos estos modelos de regresión han sido ajustados por edad y sexo, y en el caso de la presión arterial sistólica y diastólica, además los modelos de regresión han sido ajustados por diámetro de la cintura como variable de confusión.

Se han analizado también modelos de regresión incluyendo un término de interacción entre genotipos y sexo, para ver si la asociación de los genotipos en las variables respuestas ha sido diferente en hombre y mujeres. Para ello se ha utilizado el modelo de regresión lineal múltiple y logística igual que en el caso del análisis de asociación variables por genotipos. Todos estos modelos de regresión han sido ajustados por edad.

En todos los modelos de regresión, cada una de las variables de genotipo ha sido evaluada con los modelos codominante, aditivo y dominante con el fin de comparar el modelo que se ha ajustado mejor a los fenotipos estudiados. Las características de cada modelo se han descrito en la tabla 3.12. Los resultados se han presentado con los modelos que han salido significativos.

En el modelo codominante se comparan por separado el genotipo homocigoto común, el genotipo heterocigoto y el homocigoto variante. En este modelo se emplean 2 coeficientes (grados de libertad). En el modelo aditivo se supone que cada copia del alelo modifica el riesgo en una cantidad aditiva en escala logarítmica de manera que los heterocigotos tienen peso 1 y los homocigotos variantes con dos copias del alelo minoritario tienen peso 2. En el modelo dominante, se supone que una única copia del alelo minoritario, es suficiente para modificar el

riesgo. Por tanto se agrupan los genotipos heterocigoto y homocigoto variante y se comparan con el homocigoto común, de manera que dos copias del alelo minoritario tienen el mismo efecto que una ¹⁷⁰.

Tabla 3.12 - Modelos empleados para el análisis de genotipos	
Modelo Codominante	$\log[p/(1-p)] = \alpha + \beta_1\text{He} + \beta_2\text{Va} + \gamma Z$
Modelo Aditivo	$\log[p/(1-p)] = \alpha + \beta\text{Ad} + \gamma Z$
Modelo Dominante	$\log[p/(1-p)] = \alpha + \beta\text{Do} + \gamma Z$
<p>p, probabilidad de que se produzca el evento de interés de la variable respuesta. He, heterocigoto. Va, homocigoto variante. Ad, aditivo. Do, dominante, α, β, γ, parámetros estimados. Z variables por las que se desea ajustar el modelo.</p>	

En todos los modelos de regresión donde se han analizado variables de genotipo los p valores de significación estadística han sido ajustados por comparaciones múltiples por el método de *Bonferroni* para 64 SNPs. Esta técnica estadística permite ajustar el nivel de significación en relación al número de pruebas estadísticas realizadas simultáneamente sobre un conjunto de datos. Para cada prueba, el nivel de significación se calcula dividiendo el error global de tipo I (nivel de significación α) entre el número de pruebas que se han realizado.

Se han considerado las asociaciones estadísticamente significativas cuando el p valor ajustado ha resultado inferior de 0.05 Se ha denominado “ p Aj”, para la asociación genotipo-variante, y p Int. Aj” para la asociación genotipo-variante en función del sexo.

Para la interpretación de la asociación se ha realizado un análisis mediante regresión lineal para las variables continuas expresando el efecto esperado mediante β_1 para $Y = \beta_0 + \beta_1 X$, empleando regresión logística para variables binarias mediante *odds ratio* (OR), e intervalo de confianza al 95 % (IC95 %) para continuas.

En el análisis de polimorfismos de APOE (el rs429358 junto con el rs7412) se han considerado los genotipos $\epsilon_2\epsilon_2$, $\epsilon_2\epsilon_3$, $\epsilon_2\epsilon_4$, $\epsilon_3\epsilon_3$, $\epsilon_3\epsilon_4$ y $\epsilon_4\epsilon_4$ y los alelos ϵ_2 ($\epsilon_2\epsilon_2$ y $\epsilon_2\epsilon_3$), ϵ_3 ($\epsilon_2\epsilon_4$ y $\epsilon_3\epsilon_3$) y ϵ_4 ($\epsilon_3\epsilon_4$ y $\epsilon_4\epsilon_4$) en función de la siguiente combinación de nucleótidos (rs429358/rs7412 y rs429358/rs7412):

- $\epsilon_2\epsilon_2$: T/T y T/T
- $\epsilon_2\epsilon_3$: T/T y T/C
- $\epsilon_2\epsilon_4$: T/T y C/C
- $\epsilon_3\epsilon_3$: T/C y T/C
- $\epsilon_3\epsilon_4$: T/C y C/C
- $\epsilon_4\epsilon_4$: C/C y C/C

Este análisis se ha llevado a cabo mediante regresión lineal ajuntando por sexo, edad e IMC. Para el estudio del efecto de los genotipos sobre los diferentes parámetros estudiados se ha tomado como referencia el genotipo $\epsilon\epsilon$ (o alelo ϵ), empleando regresión logística para variables continuas mediante intervalo de confianza al 95 % (IC95 %). Se han considerado las asociaciones estadísticamente significativas con un p valor de 0.05.

3.2.1.1 Interacción de las variantes genéticas estudiadas con nutrientes y alimentos consumidos

El análisis de interacción de las variables genéticas en función de los nutrientes y la alimentación llevado a cabo, se ha realizado sobre el modelo de herencia aditivo mediante modelos de regresión lineal o de regresión logística según si la variable respuesta es continua o binaria, evaluando la significación del término de interacción comparando los modelos que contienen los efectos principales y los modelos añadiendo el término de la interacción. Los p -valores de significación del término de interacción han sido ajustados por *Bonferroni* teniendo en cuenta el número de polimorfismos de cada perfil. En la tabla 3.13, se presentan las variables genéticas seleccionadas, así como las variables de interacción y el número de ajustes en función del perfil. En los resultados, se han presentado los análisis que han salido significativos.

Tabla 3.13 - Variables seleccionadas para el análisis de interacción gen-dieta				
Polimorfismos pertenecientes a genes relacionados con el desarrollo de obesidad				
GEN	SNP	Variable dependiente	Variable interacción	Nº Ajuste
ADIPOQ	rs1501299	IMC y diagnóstico de IMC	Energía consumida	81
	rs2241766	Masa grasa y su clasificación	% VCT de hdc	
	rs182052	Grasa visceral y su clasificación	% VCT de proteínas	
CLOCK	rs1801260	Cintura y su clasificación	% VCT de grasas	
	rs3749474	CT y su clasificación	% VCT de agm	
	rs4580704	LDL y su clasificación	Consumo omega-3	
FTO	rs9939609	HDL y su clasificación	Consumo w6/w3	
	rs8050136	TG y su clasificación	Clasificación de apetito	
PLIN1	rs1052700	CT/HDL y su clasificación	Clasificación actividad física	
		LDL/HDL y su clasificación		
Polimorfismos pertenecientes a genes relacionados con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares				
GEN	SNP	Variable dependiente	Variable interacción	Nº Ajuste
GNB3	rs5443	IMC y diagnóstico de IMC	Energía consumida	36
MTHFR	rs1801133	Grasa visceral y su clasificación	Ingesta de ácido fólico	
NOS3	rs1799983	Cintura y su clasificación	Consumo w6/w3	
PER2	rs2304672	LDL y su clasificación	Consumo de huevos	
PON1	rs662	ApoA1	Raciones vegetales	
SERPINE1	rs6092		Raciones frutas	

ApoB ApoB/apoA1 PAS y su clasificación PAD y su clasificación				
Polimorfismos pertenecientes a genes involucrados en el proceso inflamatorio				
GEN	SNP	Variable dependiente	Variable interacción	Nº Ajuste
TNF	rs1800629	TG	Consumo w6/w3 % VCT DE agm	2
Polimorfismos pertenecientes a genes involucrados en el metabolismo lipídico				
GEN	SNP	Variable dependiente	Variable interacción	Nº Ajuste
APOB	rs512535 rs693	Grasa visceral y su clasificación CT TG	Energía consumida % VCT de hdc % VCT de grasas % VCT de ags % VCT de agm	81
APOE	rs429358 rs7412 rs405509		Consumo omega-3	
FABP2	rs1799883		Consumo w6/w3	
LPL	rs328		Consumo de leche semidesnatada	
PPARA	rs135549	PAS y su clasificación	Clasificación actividad física	
PPARG	rs1801282	PAD y su clasificación		
PAS, presión arterial sistólica. PAD, presión arterial diastólica. VCT, valor calórico total. Hdc, hidratos de carbono. Agm, ácidos grasos monoinsaturados. Ags, ácidos grasos saturados. Análisis ajustado por edad y sexo.				

Los resultados se han presentado mediante media y desviación típica.

Para la interpretación de la interacción se ha realizado un análisis estratificado mediante regresión lineal para la variable continua expresando el efecto esperado mediante β_1 para $Y = \beta_0 + \beta_1 X$, e intervalo de confianza 95 %.

3.3 ANALISIS DE LAS INTERACCIONES GEN-DIETA ENTRE MARCADORES GENÉTICOS Y DETERMINADOS COMPONENTES DE LOS ALIMENTOS MEDIANTE ENSAYOS NURIGENETICOS DE INTERVENCIÓN

3.3.1 “IDENTIFICACIÓN DE SNPS IMPLICADOS EN LA DIFERENTE RESPUESTA A UNA LECHE ENRIQUECIDA CON ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3, ÁCIDO OLEICO Y VITAMINAS”

3.3.1.1 *Estudio previo*

Para la identificación de SNPs implicados en la diferente respuesta a la leche enriquecida con ácidos grasos omega-3, se ha partido de un estudio previo desarrollado en el Departamento de Nutrición y Salud *Biosearch* S.A. en Granada, descrito en la publicación de Fonollá 2009, ²³⁷.

Se trató de un estudio de intervención nutricional de tipo longitudinal, controlado y doble ciego cuyo objetivo fue evaluar el efecto de una leche comercializada enriquecida con ácido eicosapentaenoico, ácido docosahexaenoico, oleico ácido, vitaminas A, B6, D, E, y ácido fólico en comparación con una leche semidesnatada y desnatada en voluntarios con riesgo cardiovascular moderado.

El estudio previo tuvo una duración de 12 meses y fue diseñado con tres brazos en función del tipo de leche consumida: semidesnatada (grupo SS), desnatada (grupo S) o leche enriquecida con ácidos grasos poliinsaturados omega-3, ácido oleico y vitaminas A, D, E, B6 y ácido fólico (grupo E).

La asignación del grupo se realizó de forma aleatoria y ciega, de forma que cada uno de los participantes y el investigador no conocieran cuál era el tratamiento que recibió el sujeto.

Los 297 voluntarios de entre 25 a 65 años, fueron seleccionados en base a criterios de inclusión y exclusión mediante un examen físico e historia clínica, así como una entrevista para seleccionar los sujetos con riesgo moderado sobre enfermedad cardiovascular.

La entrevista para determinar un riesgo de enfermedad cardiovascular moderada reunió los criterios que se presentan en la tabla 3.14.

Tabla 3.14 - Criterios para determinar el riesgo de enfermedad cardiovascular		
Factores	Clasificación	Puntuación
Edad	>35 (años)	1 punto
Sexo	hombre	1 punto
	post-menopausia	1 punto
Anticonceptivos orales	si	1 punto
Historia familiar de ECV	un miembro de la familia	1 punto
	más de un evento	2 puntos
Presión arterial	sistólica 121–160 mmHg	1 punto
	sistólica 161–200 mmHg	2 puntos
	sistólica >200 mmHg	4 puntos
	diastólica 81–105 mmHg	1 punto
	diastólica 106–115 mmHg	2 puntos
	diastólica >115 mmHg	4 puntos
Sobrepeso	IMC 25–29.9 kg/m ²	1 punto
Obesidad	IMC 30–39.9 kg/m ²	2 puntos
	IMC >40 kg/m ²	3 puntos
Tabaco	1–10 cigarros/día	1 punto
	11–20 cigarros/día	3 puntos
	21–40 cigarros/día	5 puntos
	>40 cigarros/día	7 puntos
Actividad física	no	1 punto
Glucemia en ayunas	116–140 mg/dl	1 punto

	141–180 mg/dl	2 puntos
	181–250 mg/dl	3 puntos
	>250 mg/dl	4 puntos
Colesterol total	175–200 mg/dl	2 puntos
	201–250 mg/dl	4 puntos
	251–300 mg/dl	6 puntos
	>300 mg/dl	8 puntos
ECV, enfermedad cardiovascular; IMC, índice de masa corporal. Fuente: ²³⁷		

Los sujetos con un resultado de entre 11 y 17 puntos fueron reclutados para el estudio previo.

Los criterios de exclusión tenidos en cuenta fueron los siguientes:

- Consumo de cualquier medicación que afecte al metabolismo de los lípidos en al menos el mes anterior al estudio.
- Embarazo.
- Cualquier enfermedad crónica o metabólica, incluyendo cualquier tipo de dislipidemia, diabetes tipo 2, o alguna enfermedad renal, hepática o gastrointestinal, así como intolerancia a la lactosa o a la proteína de la leche de vaca.

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Fundación Hospital Virgen de las Nieves (Granada, España). Se recogió el correspondiente consentimiento informado por escrito de los participantes y el estudio se ajustó a las normas éticas recogidas en la Declaración de Helsinki ^{185,237}.

La ingesta dietética fue evaluada al inicio del estudio y posteriormente a los doce meses mediante un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos que rellenaron los propios voluntarios. A los participantes se les dio instrucciones para no cambiar su dieta habitual, así como sus patrones de actividad física.

Además de la dieta habitual, los participantes se distribuyeron en tres grupos de forma aleatoria, en donde durante doce meses consecutivos tuvieron que consumir 500ml al día de leche semidesnatada enriquecida con vitaminas A y D, o 500 ml de leche desnatada enriquecida con vitaminas A y D, o 500 ml de leche enriquecida en ácidos grasos poliinsaturados omega-3, ácido oleico, vitaminas A, D, E, B6 y ácido fólico.

El producto lácteo enriquecido se preparó por la adición de una mezcla de aceites de pescado y vegetales sobre una leche desnatada, resultando en un producto con una grasa total

comparable a la contenida en la leche semidesnatada estándar (1,9 g / 100 ml), pero con un perfil de ácidos grasos diferente. Se añadieron también al producto final vitaminas A, D, E, B6 y ácido fólico. Su composición se muestra en el anexo 5.

Los diferentes productos fueron entregados a los voluntarios mensualmente.

La adherencia al tratamiento se evaluó durante el periodo de intervención mediante la realización de llamadas telefónicas de forma regular preguntando su consumo, así como mediante la recogida de los envases vacíos.

Para la caracterización de la población se recogieron datos tales como sexo, edad, así como información sobre hábitos tabáquicos (si fuma o no fuma), de actividad física (si realiza o no realiza) y de consumo de medicamentos (ninguno, para la alergia, antitrombóticos, antihipertensivos, para dermatitis, hipolipemiantes, antitiroideos, antidepresivos, antihipertensivos y otras medicaciones).

Los parámetros antropométricos se determinaron en los meses 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 donde se tomaron los siguientes datos: altura, peso, Índice de masa corporal (IMC), presión arterial y pulsaciones por minuto.

En el estudio previo se obtuvieron 20 ml de sangre total tras el ayuno de al menos 10 horas. Dichas muestras se recogieron al principio (mes 0) y al final del tratamiento (mes 12) mediante punción venosa. 1 ml fue enviado a IMDEA Alimentación para la realización de las determinaciones genéticas.

Con la sangre extraída se realizaron las siguientes determinaciones bioquímicas: glucosa, triglicéridos, colesterol total, colesterol HDL, y colesterol LDL.

Dichas determinaciones, excepto el colesterol LDL que se calculó según la fórmula de *Friedewald et al.*²⁰³, se llevaron a cabo por triplicado mediante colorimetría a partir de reactivos comerciales *Biosystems* (Barcelona, España).

Además, igualmente al principio y al final de estudio, se determinó la concentración de homocisteína total en plasma en ayunas, mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección por fluorescencia, la concentración de folato en plasma mediante inmunoensayo mediante el kit comercial (*SimulTRAC-SNB Radioensayo Kit*, *ICN Pharmaceuticals*, Costa Mesa, CA, EE.UU.), y la concentración de Proteína C reactiva se determinó mediante el kit comercial inmunofelométrico (*Dade Behring*). En el caso del folato y

de la Proteína C reactiva, las determinaciones se realizaron en el Laboratorio Clínico Referencia S.A. (Barcelona, España).

3.3.1.2 *Selección de polimorfismos genéticos*

La selección de variantes genéticas, así como el procesado y genotipado han sido realizadas en IMDEA Alimentación.

Dado que el objetivo de este estudio ha consistido en la identificación de SNPs implicados en la respuesta al diferente perfil lipídico de la leche, se ha llevado a cabo una selección de 14 polimorfismos de un solo nucleótido del total de las variantes pre-seleccionadas en el objetivo 1. Dichos polimorfismos se han escogido en base a su implicación en las rutas metabólicas involucradas en el metabolismo de los ácidos grasos, así como mediante el estudio de los mismos sobre las enfermedades cardiovasculares.

3.3.1.3 *Procesado y genotipado de muestras*

Las muestras de sangre se han enviado IMDEA Alimentación controlando las condiciones de conservación y anonimización. Una vez recibidas se han conservado a -80°C hasta su procesado. La extracción de ADN, así como la medida de la calidad y concentración de estas muestras se ha realizado con la misma metodología que en el objetivo 1.

Para llevar a cabo el análisis genético de las muestras se ha empleado la plataforma *OpenArray*® así como la plataforma *7900 HT PCR* a tiempo real para las sondas cuyos resultados no alcanzaron los niveles de calidad por encima del 90 % en la plataforma *OpenArray*®.

Se ha realizado un análisis de reproducibilidad en el que se ha repetido el mismo proceso de genotipado con 25 muestras de un total de 297 (8,4 %), obteniéndose un 99,31 % de reproducibilidad.

Para el análisis genético en la Plataforma *OpenArray*® *PCR* a tiempo real, se han utilizado chips de genotipado *TaqMan*® *OpenArray*®. La carga del chip se ha realizado de forma similar al

objetivo 1, aunque la carga del chip se ha llevado a cabo con el equipo *OpenArray® AutoLoader* y el sellado del mismo con el *OpenArray™ Case Sealing Station*.

Para el análisis genético en la Plataforma 7900 PCR a tiempo real se han utilizado placas de 384 pocillos. La carga se ha realizado añadiendo 2.50 µl de *TaqMan® Universal PCR Master Mix*, 0.25µ sonda prediseñada *TaqMan® SNP Genotyping Assays* y 2.25 µl de la muestra de ADN a una concentración aproximada de 10 ng/µL.

Para el análisis de datos se ha utilizado el mismo software que en el objetivo 1 (*TaqMan® Genotyper v1.0.1*).

3.3.1.4 *Análisis estadístico*

El análisis estadístico de los datos recogidos en este estudio se ha realizado en el departamento de estadística de IMDEA Alimentación.

Para llevar a cabo el análisis estadístico de los datos fenotípicos y genotípicos se han depurado y estudiado los valores perdidos para evitar errores.

Los datos han sido analizados con el programa estadístico R *Statistical Software* versión 2.15.

La descripción de los datos cuantitativos se ha realizado mediante media e intervalo de confianza 95 %.

Las diferencias a lo largo del tiempo se han estudiado mediante ANOVA de medidas repetidas de dos vías para evaluar el efecto del tiempo (visitas), tratamiento (grupo) y la interacción tiempo * tratamiento. Un término de interacción significativa (tiempo * tratamiento) ha sido interpretado como diferencia en la evolución entre los grupos/tratamiento. La *p* valor se ha ajustado por sexo y edad. Se ha aplicado la corrección de *Bonferroni* por análisis múltiple.

Con el objetivo de describir los resultados de los datos genéticos se ha procedido igual que en el objetivo 1. Para ello se han determinado la frecuencias por genotipos y alelos, así como el análisis de equilibrio de *Hardy-Weinberg* mediante el test de *chi-cuadrado* considerándose equilibrio cuando el *p* valor ha resultado superior a 0.05.

Para determinar si las variantes genéticas seleccionadas se encuentran en determinado grado de correlación se ha llevado a cabo el análisis de desequilibrio de ligamiento, mediante la herramienta informática Haploview 4,2; 2008, versión 3, R2, panel de análisis CEU+TSI.

Para el estudio de si ha habido diferencias antes de iniciarse el tratamiento (T0), en función de los diferentes genotipos de cada uno de los polimorfismos y el grupo de tratamiento, se ha empleado el test de *chi*-cuadrado. Se han considerado las asociaciones estadísticamente significativas cuando el p valor sin ajustar y ajustado ha resultado inferior de 0.05.

La evaluación de la diferencia en las diferentes variables entre genotipos y el tipo de tratamiento, ha sido analizada mediante el análisis de varianza de medidas repetidas, incluyendo un término de interacción entre el tiempo * tratamiento * genotipo.

Todos estos análisis han sido realizados mediante modelos codominante y dominante con el fin de comparar el modelo que se ha ajustado mejor a los fenotipos estudiados. En los resultados se han presentado con el modelo dominante que es el que ha resultado significativo.

Los análisis se han realizado sin ajustar primeramente y ajustando por comparaciones múltiples por el método de *Bonferroni* para 14 SNPs. Se han considerado las interacciones estadísticamente significativas cuando el *p* valor ajustado ha resultado inferior de 0.05.

3.3.2 “ESTUDIO DE INTERVENCIÓN NUTRICIONAL SOBRE LA EFICACIA DE LA INGESTA DIARIA DE UNA BEBIDA LÁCTEA EN VOLUNTARIOS SANOS CON SOBREPESO Y OBESIDAD”

3.3.2.1 *Tipo de estudio y consideraciones éticas*

El estudio clínico de intervención nutricional que se ha realizado es controlado, aleatorizado, doble ciego y paralelo, cuyo objetivo ha sido evaluar la eficacia de un producto enriquecido con diferentes principios activos (faseolaminas, fructo-oligosacáridos, esterolees vegetales e hidroxitirosol) sobre la modificación del peso, composición corporal y marcadores de riesgo asociados a síndrome metabólico como es el caso de la respuesta glucémica, perfil lipídico y presión arterial.

El estudio ha durado 12 semanas y ha sido diseñado con 2 brazos de estudio: por un lado, una bebida láctea funcional (BLF) y por otro una bebida láctea control (BLC).

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación del Instituto IMDEA Alimentación (Código de evaluación del comité ético: IMD PI009) y se ajusta a las normas éticas recogidas en la Declaración de *Helsinki* y a los principios de Buena Práctica Clínica.

Todos los sujetos han sido informados de las características del estudio verbalmente y por escrito mediante la hoja de información al sujeto participante y han firmado el consentimiento informado.

Para garantizar la protección de datos de los participantes se ha empleado la “Aplicación web de control de proyectos”, tal como se ha descrito en el apartado 3.1.2.

3.3.2.2 Población estudio

Los participantes para este estudio se han reclutado de la base de datos de la Plataforma “Cantoblanco” de Genómica Nutricional y Alimentación (GENYAL), según los procedimientos descritos en el apartado 3.1.1.

El cálculo del tamaño muestral se ha realizado mediante el programa estadístico: Ene 3.0 (*GlaxoSmithKline*, Madrid, España) y se ha estimado sobre la base de la variable principal de eficacia del estudio (masa grasa en kg.). Se ha empleado como referencia el estudio sobre el efecto de la faseolamina sobre los cambios de peso y composición corporal *Celleno et al.* (2007) ²³⁸. Para conseguir una potencia del 80% y un nivel de significación del 5.00 % se ha estimado necesario incluir 44 voluntarios en el grupo control y 44 en el grupo estudio. A este cálculo se ha sumado un porcentaje estimado de abandonos del 20%. Por lo que el número final de sujetos a reclutar fue de 53 voluntarios por grupo.

Los participantes han tenido que cumplir todos los siguientes criterios para ser aceptados en el estudio:

- Hombres y mujeres con edad comprendida entre 18 y 75 años.
- IMC 25-35 (Sobrepeso I, Sobrepeso II, Obesidad I).
- Adecuado nivel cultural y de comprensión del estudio clínico.
- Estar de acuerdo en participar voluntariamente en el estudio y que den su consentimiento informado por escrito.

Los participantes han sido excluidos de la participación en los estudios en caso de cumplir al menos uno de los siguientes criterios:

- IMC > 35 (Obesidad II)
- Sujetos con diagnóstico de diabetes *mellitus* insulino dependiente (tipo I).
- Sujetos con dislipemia bajo tratamiento farmacológico.

- Sujetos con hipertensión arterial bajo tratamiento farmacológico.
- Sujetos con demencia, enfermedad mental o disminución de la función cognitiva.
- Sujetos con enfermedades graves (hepática, renal, etc.)
- Sujetos que rechacen realizar los cambios de estilo de vida saludable: plan de alimentación hipocalórico individualizado y recomendaciones de actividad física.
- Sujetos que no les guste la leche o que tengan alergia a las proteínas de la leche.
- Sujetos tratados los 30 días precedentes con fármacos que modifiquen perfil lipídico o glucémico (i.e. estatinas, fibratos, diuréticos, corticoides, antiinflamatorios, hipoglucemiantes o insulina).
- Consumo de fármacos o sustancias para perder peso (salvo en aquellos casos en que se suspenda la misma 15 días antes de comenzar el estudio).
- Mujeres embarazadas o en período de lactancia.

El procedimiento de aleatorización se ha llevado a cabo mediante el Software Estadístico R versión 2.15 que ha permitido asignar de forma automática los grupos de tratamiento a los números de aleatorización.

La muestra estudiada ha contenido un total de 107 sujetos aleatorizados: 54 en el grupo de estudio y 53 en el grupo control. A lo largo del estudio se produjeron 17 abandonos y 5 sujetos más, que se excluyeron previamente del análisis de datos debido a que no llegaron a cumplir el consumo mínimo establecido para las bebidas en estudio (ingesta de los productos ≥ 75 % del pactado) o por desviaciones del protocolo que podían afectar los resultados. Como se muestra en la figura 3.11, el estudio comparativo final se realizó con un total de 85 sujetos: 44 pertenecientes al grupo de estudio (18 hombres y 44 mujeres), y 41 pertenecientes al grupo control (15 hombres y 26 mujeres), con edades comprendidas entre los 19 y 66 años.

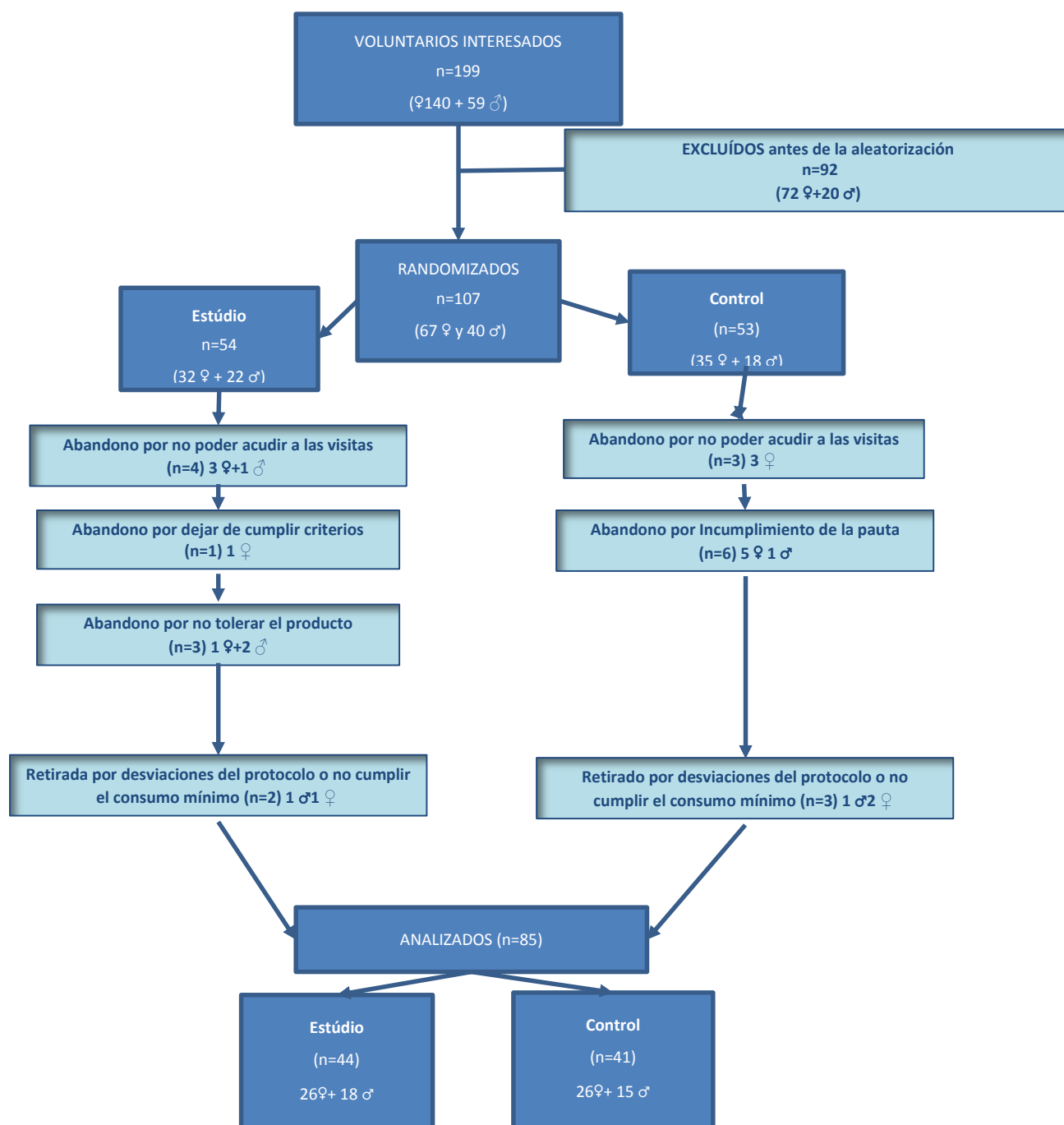


Figura 3.11 – Diagrama consort del estudio realizado.

3.3.2.3 Intervención terapéutica

Los 107 voluntarios participantes del estudio han sido aleatorizados en 2 grupos: consumidores de una bebida láctea estudio (BLE) o una bebida láctea control (BLC), durante un período de 12 semanas.

El grupo que consumió la BLE compuesto por 54 sujetos, ingirió 200 ml de bebida láctea estudio de forma diaria junto o antes de la comida.

Los participantes recibieron también un plan de alimentación y recomendaciones generales de actividad física como pautas para la mejora de su estilo de vida. El aporte calórico de la bebida fue contemplado dentro del plan de alimentación hipocalórico individualizado considerándose como una ración del grupo lácteos hipocalórica. Se adjunta un ejemplo en el anexo 7. Además, se recomendó una distribución diaria de las comidas, de forma tal que el mayor consumo de hidratos de carbono se concentrase en la comida (48%). El cálculo del calor valor calórico total de la dieta se realizó a partir del aporte de 106.5 g. de hidratos de carbono totales (426 Kcal.) lo que supone el 58% del valor calórico total.

En el caso del grupo que consumió la BLC, 53 sujetos ingirieron 200 ml de bebida láctea control siguiendo el resto de las pautas exactamente igual al grupo estudio.

Tratamientos previos y concomitantes

Cualquier tratamiento farmacológico prescrito durante el periodo de seguimiento ha sido registrado en el cuaderno de recogida de datos. El Investigador Principal ha determinado la idoneidad de la continuidad en el estudio del participante en cada caso, atendiendo a los criterios de exclusión. En este sentido, no se ha permitido la toma de ninguna medicación a lo largo del estudio salvo en casos excepcionales que han sido evaluados y anotados en el cuaderno de recogida de datos por los investigadores. Explícitamente no se ha permitido la toma de medicamentos que modifiquen el perfil lipídico o el metabolismo de la glucosa, como es el caso del uso de estatinas, fibratos, diuréticos, corticoides, antiinflamatorios, hipoglucemiantes o insulina, así como fármacos que necesiten una estrecha monitorización de sus niveles como son la digoxina, acenocumarol, warfarina, etc. Sin embargo, se permitirá el uso de cualquier medicación que no interfiera con la formulación en estudio. En caso de que los voluntarios que hayan participado en el estudio, tomaran medicación, habrán tenido que dejar dicha medicación en los 30 días anteriores al ensayo, o no participar en el mismo.

Manejo y suministro de las bebidas

Las bebidas lácteas en estudio (estudio y control) han sido entregadas a los participantes en cada visita. Los envases fueron idénticos, salvo por el color del tapón (rojo o azul) que se diferenciación para facilitar la entrega del producto según el tratamiento. En el anexo 8 se puede ver la composición nutricional de las bebidas estudio, así como las características fisicoquímicas y microbiológicas.

El control del cumplimiento se ha llevado a cabo mediante una Hoja-Diario en la que los voluntarios debían apuntar diariamente su consumo. Las Hojas-Diario se han entregado al Investigador en cada visita para realizar un seguimiento de la adhesión a la pauta.

3.3.2.4 *Desarrollo del estudio*

El estudio se ha desarrollado en dos fases: una de selección y otra experimental como se puede ver en la tabla 3.15.

Tabla 3.15 – Calendario de citas					
	Fase selección		Fase experimental		
Visita	0	1	2	3	4
Semana	-1	0	4	8	12

La visita de selección (V0) tuvo lugar antes de comenzar el estudio (semana -1) y se ejecutaron los siguientes aspectos en aquellos participantes que cumplieron los criterios de inclusión:

- Se les ha informado verbalmente y por escrito sobre el estudio, y a continuación firmaron el consentimiento informado.
- Se les ha entregado las fechas de las visitas sucesivas.
- Se les ha entregado los cuestionarios que debían traer cumplimentados para la siguiente visita:
 - ✓ Registro de consumo de alimentos y bebidas de 72 horas y cuestionario de frecuencia de consumo.
 - ✓ Cuestionario sobre actividad física.

La fase experimental se ha llevado a cabo en las instalaciones de IMDEA Alimentación y ha tenido lugar a lo largo de 12 semanas realizándose 4 visitas (aproximadamente una cada mes), como se puede ver en el anexo 9.

Visita 1 (semana 0) en la que se han recogido los siguientes datos:

- Datos generales del voluntario.
- Historia clínica.
- Hábitos de estilo de vida.
- Constantes vitales (Presión arterial y frecuencia cardíaca).
- Antropometría: Bioimpedancia (% de materia magra, % de materia grasa), peso, talla, IMC, circunferencia de la cintura.
- Estudio dietético: se recoge el “Registro de consumo de alimentos y bebidas de 72 horas”, que ha sido supervisada por el investigador.
- Escala analógica visual para evaluar la saciedad.
- Estudio de actividad física: se recoge cuestionario de actividad física que ha sido supervisada por el investigador.

En esta visita se ha realizado primera extracción sanguínea en ayunas, en la que se han analizado las siguientes variables:

- Bioquímica general:
 - ✓ Perfil lipídico (Col-t, LDL, HDL, TG, APO A1, APO B).
 - ✓ Perfil glucémico: glucemia basal, insulina, índice HOMA y HbA1c.
 - ✓ Creatinina, urato y enzimas hepáticas GOT/GPT.

Visita 2 y visita 3:

Estas han tenido lugar en la semana 4, 8 respectivamente. En estas visitas se han recogido los siguientes datos:

- Constantes vitales (presión arterial y frecuencia cardíaca).
- Antropometría: Bioimpedancia (% de materia magra, % de materia grasa), peso, talla, IMC, circunferencia de la cintura.
- Se han recogido los cuestionarios completados de: Encuesta nutricional completa, cuestionario de actividad física, el cuestionario sobre adherencia y tolerancia al consumo del producto.

En estas visitas, los participantes recibieron charlas de educación nutricional con el objetivo de mejorar sus hábitos dietéticos y de estilo de vida. Para ello impartieron cuatro charlas-

coloquios grupales: Sobre generalidades de la obesidad (definición, conceptos básicos, cálculos, importancia, pilares del tratamiento); Aprendiendo a comer (grupos de nutrientes, grupos de alimentos); Preparación de alimentos y situaciones especiales (métodos de cocinado, raelización de la compra, cómo motivarse, consejos, dietas milagro; Actividad física (beneficios, consejos, cómo empezar, cálculos).

Visita 4 (semana 12) en la que se han recogido los mismos datos que en las visitas 2 y 3 y además se ha realizado la misma bioquímica que en la visita 1.

3.3.2.5 *Recogida de datos*

Datos personales y sociosanitarios

Se han recogido los siguientes datos personales: fecha de nacimiento, sexo, así como información sobre diferentes datos sanitarios: presencia de patologías, antecedentes familiares de enfermedad cardiovascular, obesidad, cáncer, etc., datos sobre hábitos tóxicos como el consumo de alcohol o tabaco.

Medicación concomitante

Toda la medicación concomitante, tomada en el momento de ingresar en el estudio, se ha registrado con su nombre comercial.

Exploración física y Constantes vitales

Se han recogieron las siguientes variables con los procedimientos indicados en el objetivo 1: peso, altura, IMC, circunferencia de cintura y análisis de la impedancia bioeléctrica (BIA) para determinar el porcentaje de materia grasa.

Estudio dietético

Para el conocimiento de los hábitos nutricionales y dietéticos de cada participante, se ha utilizado un cuestionario dietético validado (registro de consumo de alimentos y bebidas de 72 horas), con el mismo procedimiento que en el objetivo 1.

Estos datos han permitido obtener información sobre la alimentación realizada por los participantes y fueron evaluados cuantitativa y cualitativamente utilizando para ello el Programa DIAL (versión 2.16 de 2012-Alce Ingeniería).

Patrón de actividad física

Para valorar la evolución del Patrón de actividad física de cada sujeto a lo largo del estudio se ha empleado la versión corta del “Cuestionario Internacional de Actividad Física (IPAQ, en sus siglas inglesas)” validado en población española ²³⁹. El cuestionario se divide en 4 categorías de preguntas en función del tipo de actividad del que se solicita información (vigorosa, moderada, caminar, sedentario). Los resultados han proporcionado la siguiente información:

- Cuantitativa: se ha calculado la Tasa de Metabolismo Energético (MET) TOTAL x minuto/semana para cada sujeto. Para ello, se ha tenido en cuenta el tiempo dedicado a cada tipo de actividad, siendo para actividades vigorosas MET= 8, para actividades moderadas MET= 4 y para caminar MET= 3.3.
- Cualitativa: se ha clasificado el patrón de actividad física en 3 categorías en función de los resultados:
 1. Actividad Baja:
 - ✓ No se registra actividad.
 - ✓ Se registra algo de actividad, pero no lo suficiente para encuadrarlo dentro de las categorías 2 o 3.
 2. Actividad Moderada
 - ✓ 3 o más días de actividad vigorosa al menos 20 min/día.
 - ✓ 5 o más días de actividad moderada y/o caminar al menos 30 min/día.
 - ✓ 5 o más días de cualquier combinación de caminar, actividad moderada o vigorosa
 - ✓ TOTAL MET min/semana \geq 600

3. Actividad Alta

- ✓ Actividad vigorosa al menos 3 días/semana y acumular por lo menos TOTAL MET min/semana ≥ 1500 .
- ✓ 7 o más días de cualquier combinación de caminar, actividad moderada o vigorosa con un TOTAL MET min/semana ≥ 3000 .

Escala analógica visual para evaluar saciedad

Para valorar el apetito y la saciedad de los voluntarios se ha utilizado una Escala Analógica Visual (VAS) validada ^{240,241}. Para ello, los voluntarios han tenido que marcar en las VAS su grado de:

- Hambre: desde «No tengo nada de hambre» hasta «Estoy lo más hambriento que he estado nunca».
- Saciedad: desde «No tengo nada de sensación de saciedad» hasta «Estoy lo más saciado que he estado nunca».
- Plenitud: desde «No tengo nada de sensación de plenitud» hasta «Tengo la mayor sensación de plenitud que he tenido nunca».
- Deseo de ingerir algún alimento: desde «No tengo ningún deseo de ingerir algún alimento» hasta «Tengo el mayor deseo de ingerir algún alimento que he tenido nunca»).
- Deseo de ingerir algo graso, salado, dulce o sabroso: desde «No tengo nada de deseo de ingerir algo graso, salado, dulce o sabroso» hasta «Tengo el mayor deseo de ingerir algo graso, salado, dulce o sabroso que he tenido nunca».

La valoración de la escala VAS, presentada en el anexo 10, se evaluó de 0 (mínimo) a 10 (máximo). La escala VAS, se realizó en cinco tiempos relacionados con el consumo del producto: 0 min (basal y en ayunas), 30 min (20 min después consumir un desayuno estandarizado con un 60% de hidratos de carbono) 60 min, 90 min, 120 min realizado en parte de la muestra.

El desayuno estandarizado que recibieron consistió en:

- Barra de pan 100 g.
- Aceite 10 cc.
- Batido.
- Agua 330 cc.

La composición nutricional (macronutrientes) del desayuno, se describe a continuación en la tabla 3.16.

Tabla 3.16. Composición nutricional del desayuno estandarizado para estudio en agudo				
	Cantidad	Hidratos de Carbono	Proteínas	Grasas
Aceite (g.)	10	0	0	10
Pan (g.)	100	65	11	0
Batido estudio/control (g.)	200	18	8	7
Total (g.)		83	19	17
Total (kcal.)		332	76	153
VCT (%)		59,2	13.5	27.3
VCT DESAYUNO (kcal.)	561			
HdC del VCT (%)	59,2			
HdC del desayuno (g)	83			
HdC del desayuno (kcal)	332			
VCT, valor calórico total. HdC, hidratos de carbono.				

Adherencia y tolerancia a los productos

Se ha evaluado en todas las visitas la adherencia y tolerancia al consumo, comprobando el cumplimiento en el Diario del consumo del producto del participante y aplicando un cuestionario que pregunta al voluntario si ha padecido alguno de los siguientes síntomas: Nauseas, acidez, diarrea, distensión abdominal, halitosis, estreñimiento, repite el sabor.

Registro de acontecimientos adversos

Durante el transcurso de cada visita se ha preguntado al sujeto de forma abierta sobre los cambios en su estado de salud desde la última visita.

Determinaciones Bioquímicas

Se han llevado a cabo 2 extracciones sanguíneas en las visitas V1 y V4. Las muestras de sangre han sido obtenidas a primera hora de la mañana, con el sujeto en ayunas de 12 h, por punción venosa (vena cubital media del codo). Las extracciones han sido realizadas por personal cualificado y acreditado proporcionado por el Laboratorio CQS (*Consulting* Químico Sanitario).

Laboratorio clínico privado acreditado en España por ENAC (Entidad Nacional de Acreditación) según la norma internacional UNE-ISO 15189:2007 (Nº 659/LE1318).

Estudio genético

El análisis genético se ha llevado a cabo mediante muestras de sangre total por punción venosa (vena cubital media del codo), recogidas en la misma extracción que se realizó para las determinaciones bioquímicas.

La extracción de ADN, el genotipado, así como el análisis de datos y parámetros de calidad, se han realizado de la misma forma que en la metodología del objetivo 1.

3.3.2.6 *Evaluación de la respuesta al tratamiento*

Para la evaluación de la eficacia del tratamiento, se ha considerado como variable principal el efecto del consumo de la bebida láctea estudio sobre la modificación de la composición corporal (masa grasa - kg) medida por bioimpedancia (BIA). A demás, se han evaluado otras variables secundarias:

- Efecto del producto sobre el metabolismo de la glucosa: glucemia basal, insulina, índice HOMA y HbA1c.
- Evolución de otras variables antropométricas (peso corporal, IMC, circunferencia de la cintura) y constantes vitales: presión arterial y frecuencia cardíaca.
- Evolución de diferentes marcadores del perfil lipídico (TG, CT, LDL, HDL, Apo A1, Apo B, cocientes CT/HDL y LDL/HDL).
- Seguridad del producto a través de diferentes variables de control: urea, creatinina, enzimas hepáticas GOT/GPT
- Tolerancia, consumo y percepción sensorial de la bebida estudio.
- Efecto del producto sobre la saciedad.

A su vez, se ha evaluado posibles signos y síntomas correspondientes a efectos secundarios relacionados con el consumo de la bebida láctea estudio, de manera que han sido recogidos en el formulario correspondiente para documentar la tolerabilidad a los mismos. Estos registros han contenido información sobre la naturaleza, severidad, tiempo de inicio y tiempo de duración de las reacciones adversas, las acciones tomadas para

revertirlas y la probabilidad de que guarden relación con el tratamiento del ensayo, además de cualquier otra cuestión que se haya estimado oportuna.

3.3.2.7 *Análisis estadístico*

El análisis estadístico de los datos recogidos en este estudio se ha realizado en el departamento de estadística de IMDEA Alimentación. Para llevar a cabo el análisis estadístico los datos recogidos se han depurado y estudiado los valores perdidos para evitar errores. Posteriormente las variables se han recodificados y generado de estas, nuevas variables para analizar (grupos, sumatorios, etc.).

Los datos han sido analizados con el programa estadístico *R Statistical Software* versión 2.15.

La descripción de los datos cualitativos se ha realizado en forma de frecuencias absolutas y porcentajes y los datos cuantitativos mediante media y desviación estándar (DT) y error estándar de la media (SEM) o mediante media e intervalo de confianza 95 %, según sea la distribución de los datos. En la comparación de datos cuantitativos entre los dos grupos, se ha utilizado el test de la *t-Student* como prueba paramétrica y el test de la U de *Mann-Whitney* o *Wilcoxon* como prueba no paramétrica. Para comparar proporciones de datos cualitativos entre los dos grupos se ha utilizado el test *chi-cuadrado* o test de *Fisher* según ha correspondido.

Las diferencias a lo largo del tiempo se han estudiado mediante ANOVA de medidas repetidas de dos vías para evaluar el efecto del tiempo (visitas), tratamiento (grupo) y la interacción tiempo * tratamiento. Un término de interacción significativa (tiempo * tratamiento) ha sido interpretado como diferencia en la evolución entre los grupos/tratamiento. La *p* valor se ha ajustado por sexo y edad, por el porcentaje de consumo de los batidos, el valor calórico total de la dieta realizada en relación a la indicada y los METs del ejercicio realizado en relación a la media (para minimizar las diferencias del efecto de esas variables). Se ha aplicado la corrección de *Bonferroni* por análisis múltiple.

Se han considerado las interacciones estadísticamente significativas cuando el *p* valor sin ajustar ha resultado inferior de 0.05.

Con el objetivo de describir los resultados de los datos genéticos se han determinado la frecuencias por genotipos y alelos con la misma metodología que en el objetivo 1, así como el

análisis de equilibrio de *Hardy-Weinberg* para cada polimorfismo genético. El p valor ha sido calculado mediante el test exacto debido a que el número de heterocigotos y homocigotos variantes ha sido muy reducido y la p no era representativa. El resto de datos han sido analizados mediante el test el test de *chi*-cuadrado.

La evaluación de la diferencia en las diferentes variables entre genotipos y el tipo de tratamiento, ha sido analizada mediante el análisis de varianza de medidas repetidas, incluyendo un término de interacción entre el tiempo * tratamiento * genotipo.

Todos estos análisis han sido ajustados con los modelos codominante y dominante con el fin de comparar el modelo que se ha ajustado mejor a los fenotipos estudiados.

Los análisis se han realizado ajustando por comparaciones múltiples por el método de *Bonferroni* para 64 SNPs.

4. RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE LA POBLACIÓN DE LA PLATAFORMA CANTOBLANCO PARA ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN Y ENSAYOS CLÍNICOS DE INTERVENCIÓN

4.1.1 RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

4.1.1.1 *Características generales, sociodemográficas y socioeconómicas de la población estudiada*

Se ha incluido un total de 557 voluntarios de la Plataforma “Cantoblanco” de Genómica Nutricional y Alimentación: 155 (27.80 %) hombres y 402 (72.20 %) mujeres, con una edad media de 37.6 años (DT: 12.38) y edades comprendidas entre los 18 y 66 años.

La mayoría de la población (89 %), ha referido tener origen geográfico europeo mediterráneo como se puede ver en la figura 4.1.

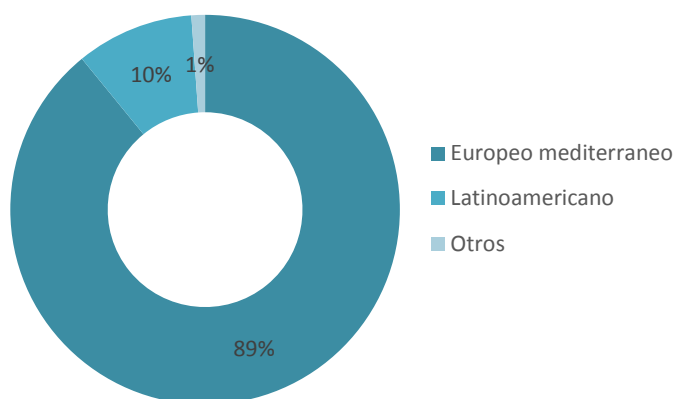


Figura 4.1– Clasificación de la muestra según el origen geográfico (etnia).

El estado civil de la población estudiada ha resultado ser mayoritariamente soltero (58.40 %), seguido de casado (36.10 %).

En cuanto al nivel de estudios, el 74.40 % de la población estudiada ha realizado o está realizando estudios superiores. Un 16.92 % han cursado o están cursando estudios de grado medio. Un 5.26 % de la población solo ha cursado estudios de secundaria, y 1.88 % de la población ha cursado únicamente estudios primarios.

Respecto a la ocupación profesional, la mayoría de la población estudiada (76.30 %) se encuentra trabajado, seguido de un 16.54 % de la población que se encuentra estudiado.

4.1.1.2 Características socio-sanitarias del colectivo estudiado

Con respecto al historial clínico de la población estudiada, se han obtenido un total de 490 cuestionarios completos del total de los 557 voluntarios reclutados. Se ha observado que el hipercolesterolemia es la enfermedad más frecuente (5.71 %), seguida del hipotiroidismo (4.69 %). No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas por tipo de enfermedad entre hombres y mujeres.

En cuanto a la medicación consumida el 14.60 % de la población femenina consume anticonceptivos orales. Otro tipo de medicamentos consumidos son los antiácidos (2.86 %), antihistamínicos (2.86 %) y hormona tiroidea (2.45 %). No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres con respecto al consumo de medicación.

En la tabla 4.1 se puede observar la distribución de las diferentes enfermedades y medicación consumida de la población estudiada.

Tabla 4.1 - Enfermedades asociadas, consumo de fármacos y otras sustancias en la población estudiada (%)				
	Total (n= 490) %	Hombres (n= 128) %	Mujeres (n= 362) %	p
Enfermedades asociadas				
Intolerancia a la lactosa	0.20	0.80	0.00	0.9964
Hipertiroidismo	0.41	0.00	0.60	-
Hipotiroidismo	4.69	0.80	6.10	0.0610
Hipercolesterolemia	5.71	6.20	5.50	0.6467
Hipertrigliceridemia	0.41	1.60	0.00	0.9961
Hipertensión arterial	1.63	2.30	1.40	0.2249
Diabetes <i>mellitus</i>	0.41	0.80	0.30	0.3322
Depresión	0.20	0.00	0.30	-
Medicamentos consumidos				
Anticonceptivos orales	10.82	0.00	14.60	-
Anticonceptivo no orales	1.82	0.00	2.50	-
Antidepresivo	0.82	0.00	1.10	-
Antiácidos	2.86	3.10	2.80	0.5110

Antihistamínicos	2.86	0.80	3.60	0.1273
Antiinflamatorios	0.41	0.00	0.60	-
Suplemento de hierro	1.02	0.00	1.40	-
Suplemento de calcio	1.43	0.80	1.70	0.6221
Hipotensores	1.22	0.80	1.40	0.8112
Hormona tiroidea	2.45	1.60	2.80	0.5852
p, valor de comparación entre los grupos, 0.05 para considerarse diferencia estadísticamente significativa. El análisis se ha realizado teniendo en cuenta la variable de confusión edad.				

Con respecto a los antecedentes familiares de la población estudiada, se ha observado que la hipertensión arterial (29.59 %), junto con las enfermedades cardiovasculares (22.04 %, contemplando el infarto de miocardio, cerebrovascular, cardiopatías, valvulopatías, arritmias e insuficiencia cardíaca) son las patologías más frecuentes, seguidas de las enfermedades oncológicas (21.22 %) en los familiares de primer grado (madre y padre). No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres con respecto a las enfermedades contempladas.

Con respecto a los familiares de segundo grado (abuelos), se ha observado que las enfermedades oncológicas (25.51 %), junto con las enfermedades cardiovasculares (17.55 %) son las patologías más frecuentes. No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres con respecto a las enfermedades contempladas.

En la tabla 4.2 se puede observar la distribución de las diferentes enfermedades de los familiares de la población estudiada.

Tabla 4.2 - Antecedentes familiares de enfermedad en la población estudiada (%)				
	Total (n = 490) %	Hombres (n = 128) %	Mujeres (n = 362) %	p
Antecedentes Familiares 1º grado				
Cardiovasculares	22.04	20.30	22.70	0.9611
Hipertensión Arterial	29.59	26.60	30.70	0.6290
Dislipemia	4.29	3.10	4.70	0.3503
Diabetes	14.49	12.50	15.20	0.7251
Obesidad	14.69	13.30	15.20	0.8436
Enf. Oncológica	21.22	14.80	23.50	0.1566
Antecedentes Familiares 2º grado				
Cardiovasculares	17.55	13.30	19.10	0.0672
Hipertensión Arterial	9.39	9.40	9.40	0.6260
Dislipemia	1.02	0.80	1.10	0.6313
Diabetes	15.51	11.70	16.90	0.0759

Obesidad	4.90	4.70	5.00	0.6974
Enf. Oncológica	25.51	25.80	25.40	0.4776
<i>p</i> , valor de comparación entre hombres y mujeres, 0.05 para considerarse diferencia estadísticamente significativa. El análisis se ha realizado teniendo en cuenta la variable de confusión edad.				

Se ha estudiado la posible asociación de los antecedentes familiares con las enfermedades padecidas por la muestra, encontrándose una asociación significativa en el caso de la dislipemia, considerándose los casos de hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia ($p < 0.0001$). Así, el 28.57 % de la población que afirma tener dislipemia, posee antecedentes familiares de la misma, frente al 4.90 % de la población que también la padece, pero sin antecedentes familiares registrados.

4.1.1.3 *Datos sobre estilo de vida*

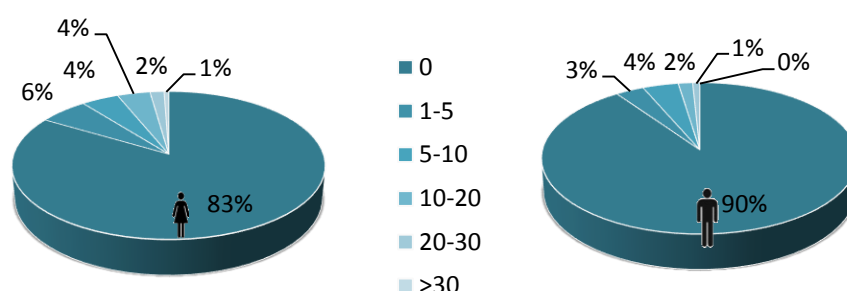
Con respecto a los parámetros psicológicos y de hábito tabáquico, se han obtenido un total de 466 cuestionarios completos del total de 557 voluntarios reclutados.

La mayor parte de la población estudiada no ha reportado ningún tipo de trastorno psicológico, sin embargo, un 31.97 % de la población considera que padece estrés, y el 15.88 % de la población padece ansiedad. No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres con respecto al estrés, pero sí con respecto a la ansiedad, siendo más elevado el número de mujeres que se han considerado con ansiedad, con respecto a los hombres ($p = 0.0071$). El porcentaje de población que ha reportado trastornos de conducta alimentaria (bulimia, anorexia nerviosa, trastorno por atracón o vigorexia) ha sido del 1.72 %, y no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres.

Como se puede observar en la tabla 4.3, en cuanto al hábito tabáquico, se ha observado que la mayoría de la población estudiada no es fumadora. En cambio, la mayor parte de la población consume una o más de una bebida alcohólica (o ración) a lo largo de la semana. Se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres, donde el 74.60 % de la población masculina consume alcohol, frente al 59.30 % de las mujeres ($p = 0.0058$).

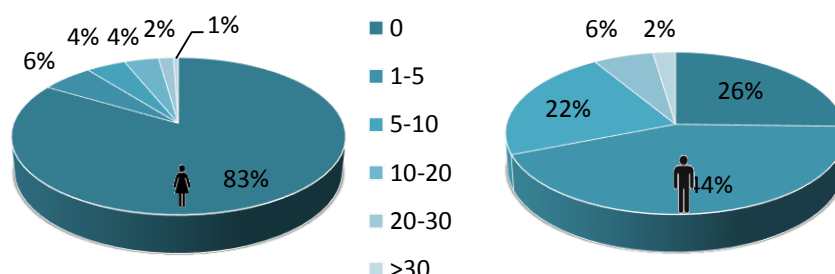
Tabla 4.3 - Parámetros psicológicos y consumo de tabaco y alcohol en la población estudiada según sexo (%)				
	Total	Hombres	Mujeres	p
	(n= 466)	(n= 123)	(n= 343)	
	%	%	%	
Parámetros psicológicos				
Estrés	31.97	24.40	34.70	0.0615
Ansiedad	15.88	7.30	19.00	0.0071
Trastornos de conducta alimentaria	1.72	0.80	2.00	0.3835
Otros	0.00	0.00	0.00	
Consumo de tabaco y alcohol				
Consumo tabaco	14.76	9.80	16.50	0.0895
Consumo alcohol	63.33	74.60	59.30	0.0058
p, valor de comparación entre hombres y mujeres, 0.05 para considerarse diferencia estadísticamente significativa. El análisis se ha realizado teniendo en cuenta la variable de confusión edad.				

En las figuras 4.2 y 4.3 se muestran los patrones de consumo de tabaco y alcohol de la muestra estudiada.



$p = 0.5050$

Figura 4.2 – Clasificación según el consumo de cigarrillos diarios en la población estudiada por sexo (%).



$p < 0.0001$

Figura 4.3 – Clasificación según el consumo (raciones) de alcohol a la semana en la población por sexo (%).

El porcentaje de consumo de bebidas fermentadas es considerablemente mayor que el consumo de bebidas destiladas, tanto en hombres como en mujeres, encontrándose diferencias estadísticamente significativas con respecto a las bebidas fermentadas entre hombres y mujeres ($p = 0.0151$).

Según el cuestionario de frecuencias de consumo de alimentos, en el que se han obtenido un total de 260 cuestionarios completos del total de 557 voluntarios reclutados, la edad media de comienzo de consumo de alcohol en la población estudiada es de 18 años de edad, comenzando los hombres a los 16 años de edad media (DT: 2.40) y las mujeres a los 19 años de edad media (DT: 4.01). Existen diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres para los años que llevan consumiendo alcohol [hombres: 3.58 años (DT: 6.60) y mujeres 1.45 años (DT: 3.80) $p = 0.0093$].

En el caso del consumo de alcohol la ingesta de diferentes tipos de bebidas es más alta en hombres que en mujeres como se puede ver en la siguiente tabla 4.4.

Tabla 4.4 - Datos sobre el consumo de bebidas alcohólicas ($\bar{X} \pm DT$)				
	Total	Hombres	Mujeres	p
	n = 260	n = 69	n = 191	
Años bebiendo alcohol	2.03 \pm 4.80	3.58 \pm 6.60	1.45 \pm 3.80	0.0093
Consumo de vino (raciones/día)	0.27 \pm 0.44	0.40 \pm 0.56	0.22 \pm 0.37	0.0002
Consumo de cerveza (raciones/día)	0.26 \pm 0.35	0.36 \pm 0.42	0.22 \pm 0.31	0.0026
Consumo de licores destilados (raciones/día)	0.09 \pm 0.18	0.19 \pm 0.27	0.06 \pm 0.12	0.0006
p , valor de comparación entre hombres y mujeres significativa 0.05. El análisis se ha realizado teniendo en cuenta la variable de confusión edad.				

Con respecto a los datos sobre la actividad física, se han obtenido 467 cuestionarios completos del total de los 557 voluntarios reclutados. El porcentaje de sujetos clasificados como sedentarios es del 35.76 % del total, clasificados de acuerdo a las recomendaciones de la *American Heart Association* ¹⁹⁷. En el caso de la población masculina, el porcentaje de sedentarios (25.20 %) es menor que en la población femenina (39.40 %), encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres, como se puede observar en la figura 4.4.

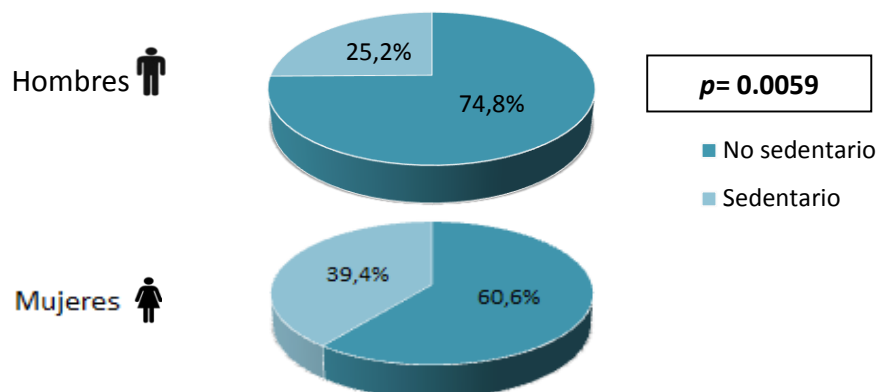


Figura 4.4 – Porcentaje de la población clasificada como sedentaria de acuerdo a la Asociación Americana del Corazón en hombres y mujeres ¹⁹⁷.

Con respecto al tipo de actividad física realizada, se ha podido observar que la población masculina refiere realizar mucha más actividad física categorizada como intensa, mientras que en la población femenina, los METs se distribuyen de forma más o menos homogénea entre los diferentes tipos de actividades.

4.1.1.4 Medidas antropométricas y constantes vitales

Respecto a la caracterización antropométrica de la población estudiada, la tabla 4.5 muestra el análisis antropométrico y de constantes vitales.

Tabla 4.5 - Datos antropométricos y constantes vitales (X ± DT)				
	Total	Hombres	Mujeres	P
	n = 557	n = 155	n = 402	
Peso (kg)	72.06 ±15.59	84.29 ± 14.7	67.69 ± 13.45	< 0.0001
Peso Habitual (kg)	69.86 ± 14.85	83.65 ± 13.59	65.51 ± 12.37	< 0.0001
Talla (cm)	165.98 ± 8.86	176.26 ± 6.44	162.30 ± 6.36	< 0.0001
IMC (kg/m ²)	26.10 ± 4.86	27.18 ± 4.78	25.72 ± 4.84	0.0354
Circunferencia cintura (cm)	87.00 ± 14.46	94.39 ± 14.07	84.41 ± 13.71	< 0.0001
Circunferencia cadera (cm)	104.87 ± 9.95	106.19 ± 9.05	104.41 ± 10.21	< 0.0001
Composición corporal:				
Grasa corporal (%)	33.57 ± 9.73	24.87 ± 7.96	36.66 ± 8.34	< 0.0001
Masa muscular (%)	28.96 ± 5.65	35.76 ± 4.93	26.57 ± 3.58	< 0.0001
Grasa visceral (BIA)	7.21 ± 3.92	9.75 ± 5.30	6.32 ± 2.80	< 0.0001

Constantes vitales:				
PAS (MmHg)	122.24 ± 14.79	130.88 ± 10.89	119.20 ± 14.79	< 0.0001
PAD (MmHg)	73.62 ± 10.43	75.58 ± 9.60	72.94 ± 10.63	0.9552
<i>p</i> , valor de comparación entre hombres y mujeres, 0.05 para considerarse diferencia estadísticamente significativa. El análisis se ha realizado teniendo en cuenta la variable de confusión edad. Además, en el caso de la presión arterial sistólica (PAS) y diastólica (PAD) también se ha ajustado por diámetro de cintura.				

Se ha evaluado el estado nutricional de la población por el IMC, según la clasificación de la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad en el año 2007, mostrándose los resultados en la figura 4.5.

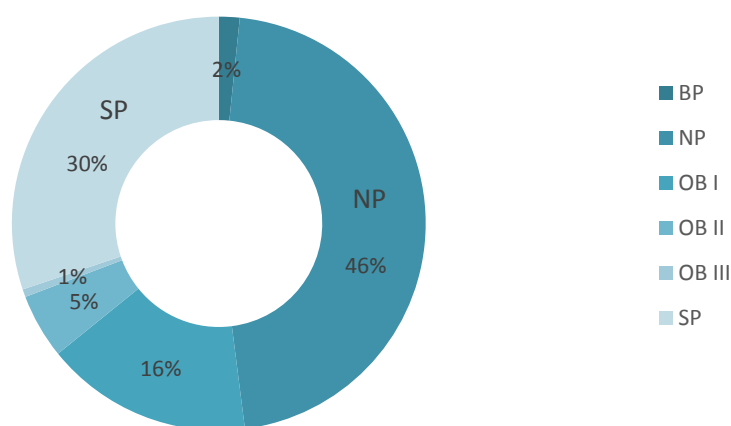


Figura 4.5 – Clasificación de la muestra según el diagnóstico nutricional de acuerdo al IMC ².

Las diferencias entre sexos con respecto al IMC se presentan en la figura 4.6.

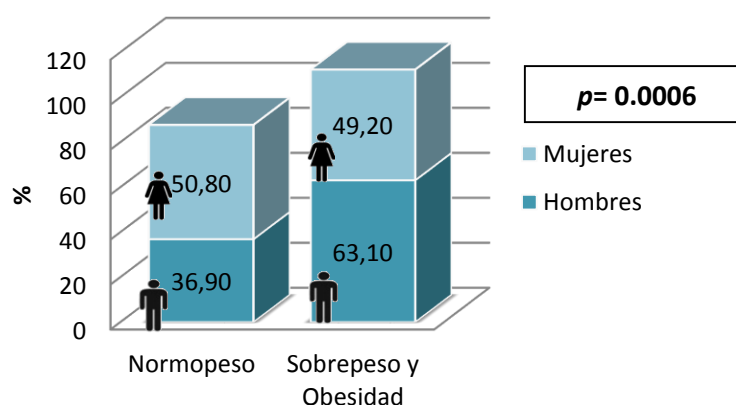


Figura 4.6 – Clasificación del estado nutricional por sexo de acuerdo al IMC ².

Con respecto a la circunferencia de la cintura, el 49.00 % de la población estudiada ha presentado medidas elevadas, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres para dicha clasificación ($p = 0.5684$).

En el caso del porcentaje de grasa corporal, y considerando elevado un porcentaje mayor al 33.00 % en mujeres y 25.00 % en hombres, se ha observado elevado en el 61.15 % del total de la muestra (64.80 % en la población femenina y 50.80 % en la población masculina, $p = 0.0763$). En el caso de la grasa visceral, se ha observado un mayor porcentaje de población masculina con niveles elevados, en comparación con la población femenina ($p < 0.0001$).

En la figura 4.7, se muestran los diferentes porcentajes de población en función del tipo de grasa corporal, según el género.

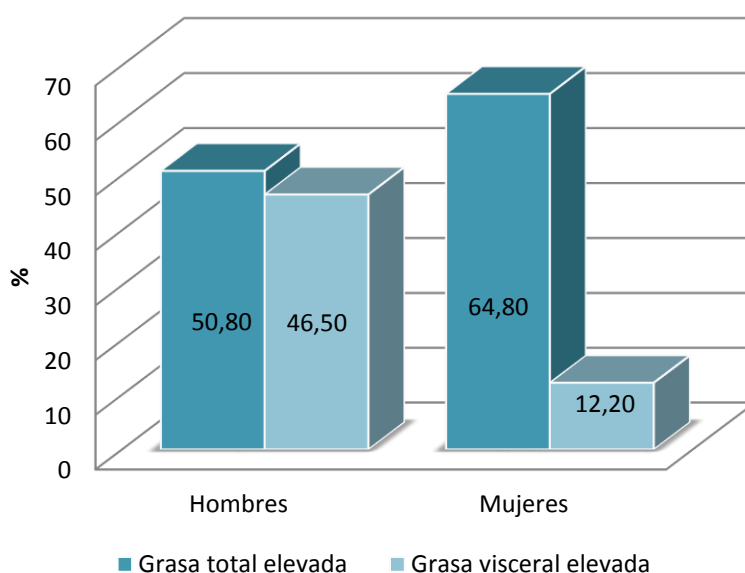


Figura 4.7 - Porcentaje de población con valores de grasa corporal elevadas en función del sexo.

Con respecto a la clasificación de la presión arterial, la mayoría de la población presenta niveles normales tanto de presión sistólica como diastólica. En el caso de la población masculina, la presión sistólica ha presentado mayor porcentaje de hipertensión (23.60 %) frente a la población femenina (10.00 %), encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres ($p = 0.0020$). No se han encontrado diferencias entre sexo en el caso de la presión arterial diastólica.

4.1.1.5 Valoración dietética

Con respecto a la valoración dietética, se han obtenido un total de 518 cuestionarios completos del total de 557 voluntarios reclutados. La ingesta energética media obtenida de la valoración del registro de consumo de alimentos y bebidas de 72 horas, ha sido de 2094 Kcal (DT: 628), en el caso de los hombres 2325 Kcal (DT: 650) y en la población femenina 2009 Kcal (DT: 598.16), $p > 0.05$.

En cuanto a la ingesta de macronutrientes y fibra, en la tabla 4.6 y figura 4.8 se han presentado las cantidades diarias de la ingesta de nutrientes, así como su relación con las recomendaciones.

Tabla 4.6 - Cantidades diarias cubiertas de ingesta de nutrientes y su relación con la recomendación ($X \pm DT$)

	Valores aportados por la dieta				Valores Recomen dados*
	Total	Hombres	Mujeres	<i>p</i>	
	(n = 518)	(n = 140)	(n = 378)		
<i>Macronutrientes</i>					
Hidratos de Carbono (% VCT)	38.31 ± 6.38	37.79 ± 6.99	38.50 ± 6.14	0.2606	55
Azúcares sencillos (% VCT)	17.58 ± 5.17	16.54 ± 5.10	17.96 ± 5.16	0.0056	10
Fibra (g)	20.20 ± 11.89	23.57 ± 14.64	21.68 ± 10.67	0.1079	16-24
Proteínas (% VCT)	17.24 ± 3.35	17.23 ± 3.27	17.25 ± 3.38	0.9585	15
Lípidos (% VCT)	40.03 ± 6.35	39.98 ± 6.38	40.04 ± 6.35	0.9202	30
AGS (% VCT)	13.04 ± 2.83	13.18 ± 2.87	12.99 ± 2.82	0.4997	< 7-10
AGM (% VCT)	17.81 ± 3.71	17.60 ± 3.65	17.89 ± 3.73	0.4259	15-30
AGP (% VCT)	5.55 ± 1.63	5.57 ± 1.83	5.54 ± 1.55	0.866	06-10
Colesterol (mg/día)	318.50 ± 133.89	373.60 ± 147.83	318.22 ± 125.28	0.0001	<300
<i>p</i> , valor de comparación entre los grupos, 0.05 para considerarse diferencia estadísticamente significativa.					
VCT, valor calórico total.					
*Fuente: ¹⁹⁰					

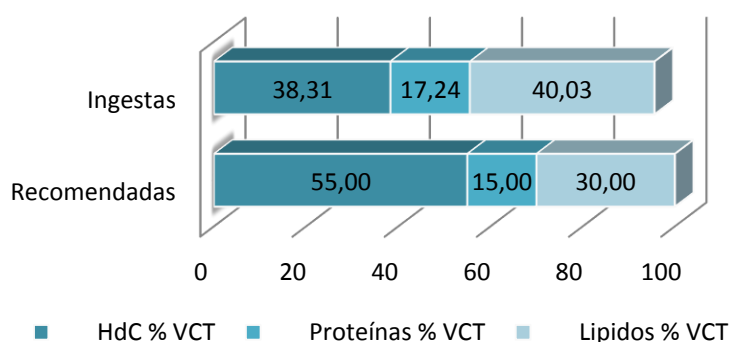


Figura 4.8 – Porcentaje cubierto de la ingesta de macronutrientes y su relación con la recomendación ¹⁹⁰.
HdC, hidratos de carbono. VCT, valor calórico total.

Con respecto a la ingesta de micronutrientes, en la tabla 4.7 y figura 4.9 se han presentado las cantidades diarias cubiertas de la ingesta de nutrientes en base a las recomendaciones, así como su relación con la cantidad diarias recomendadas.

Tabla 4.7- Ingestas de micronutrientes (X ± DT)					
	Total (n = 518)	Hombres (n = 140)	Mujeres (n = 378)	p	CDR*
Vitamina B1 (tiamina) mg	1.44 ± 0.59	1.59 ± 0.73	1.38 ± 0.52	0.0005	1.1
Vitamina B2 (riboflabina) mg	1.90 ± 0.70	2.03 ± 0.73	1.86 ± 0.68	0.0236	1.4
Vitamina B3 (niacina) mg	36.62 ± 12.00	40.87 ± 12.41	35.05 ± 11.47	0.0075	16
Vitamina B12 (cobalamina) µg	6.59 ± 4.82	7.87 ± 5.86	6.12 ± 4.29	0.0003	2.5
Ácido fólico µg	285.41 ± 126.15	299.20 ± 157.09	280.30 ± 112.38	0.0978	200
Vitamina C (ácido ascórbico) mg	133.25 ± 77.99	128.69 ± 70.09	134.94 ± 80.74	0.6818	80
Vitamina D (calciferol) µg	3.46 ± 3.90	4.09 ± 3.57	3.22 ± 4.00	0.0705	5.0
Magnesio mg	222.79 ± 182.49	334.01 ± 157.4	308.46 ± 118.01	0.0322	375
Hierro mg	14.42 ± 5.32	15.62 ± 6.31	13.97 ± 4.84	0.0047	14
Zinc mg	10,05 ± 3.49	11.01 ± 4.07	9.7 ± 3.18	0.0004	10
Iodo µg	103.20 ± 43.11	111.22 ± 44.4	100.23 ± 42.3	0.0103	150

p, valor de comparación entre los grupos, 0.05 para considerarse diferencia estadísticamente significativa.
El análisis se ha realizado teniendo en cuenta la variable de confusión edad.
CDR, cantidades diarias recomendadas usadas en el etiquetado nutricional.
* Fuente: ²⁴²

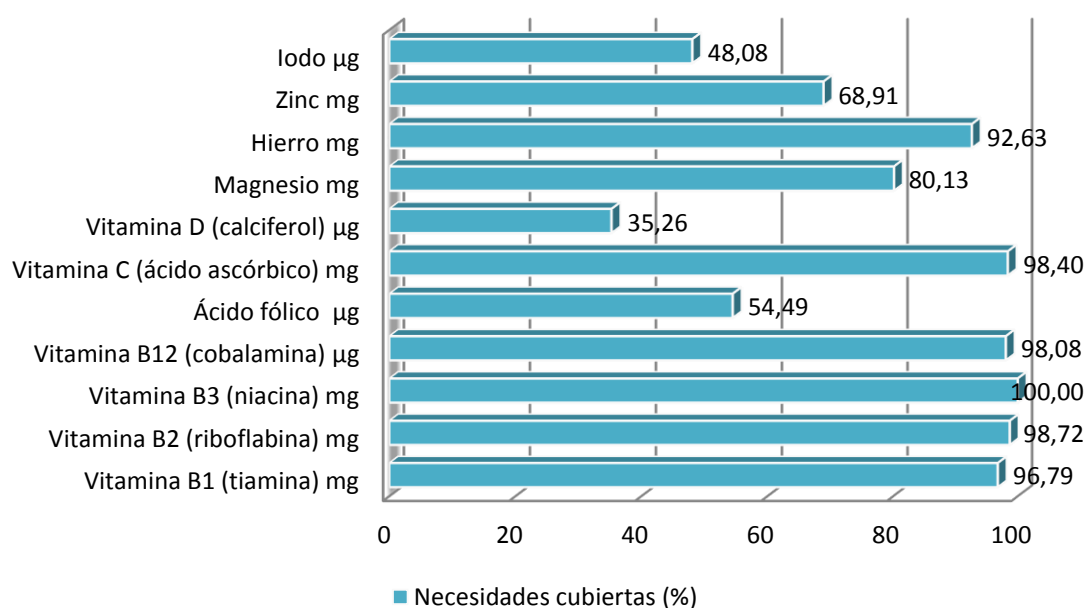


Figura 4.9 - Porcentaje cubierto de vitaminas y minerales en función a las ingestas recomendadas ¹⁹⁰.

En lo referente al número de comidas diarias realizadas, se ha observado que el porcentaje de población estudiada que realiza más de tres comidas al día es de media de un 63.80 % encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres (53.90 % y 67.30 % respectivamente. $P = 0.0059$).

En el caso del grado de apetito, los resultados han mostrado que un 51.64 % de la población total se considera con un nivel de apetito habitualmente elevado, frente al 42.62 % que se considera con un apetito medio. Tan solo un 5.74 % se considera con un grado reducido. Aunque la tendencia es similar en hombres y en mujeres, ha resultado mayor el porcentaje de hombres con apetito elevado (62.99), que en el caso de las mujeres (47.65 %).

Con respecto al consumo de los diferentes grupos de alimentos, en la tabla 4.8 se han descrito el número de raciones consumidas por grupos de alimentos de acuerdo a los resultados pertenecientes al cuestionario de 72 horas, así como los valores recomendados de ingesta para cada grupo.

Tabla 4.8 - Raciones consumidas de los diferentes grupos de alimentos ($\bar{X} \pm DT$)					
	Total	Hombres	Mujeres	p	Valores Recomendados ¹
	n = 518	n = 140	n = 378		
Carnes, pescados y huevos	3.07 \pm 1.32	3.50 \pm 1.34	2.91 \pm 1.28	0.0416	2/día
Lácteos	2.07 \pm 1.12	2.12 \pm 1.16	2.05 \pm 1.10	0.1683	2-4/día
Frutas	1.51 \pm 1.31	1.38 \pm 1.21	1.56 \pm 1.34	0.3742	> 3/día
Vegetales	2.95 \pm 1.64	2.88 \pm 1.60	2.97 \pm 1.65	0.4074	> 2/día
Cereales, pan, pasta...	4.51 \pm 2.18	5.12 \pm 2.70	4.28 \pm 1.91	0.0001	4-6/día
p , valor de comparación entre los grupos, 0.05 para considerarse diferencia estadísticamente significativa. El análisis se ha realizado teniendo en cuenta la variable de confusión edad.					
¹ Fuente: ¹⁹² .					

Se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres con respecto al consumo de carnes, pescados y huevos, donde dicho consumo es más elevado en la población masculina ($p = 0.0416$), así como sobre el consumo de cereales donde igualmente es más elevado en hombres que en mujeres ($p = 0.0001$).

4.1.1.6 Bioquímica

Con respecto a los parámetros bioquímicos analizados, en la tabla 4.9 se han reflejado los valores medios de un total de 447 voluntarios del total de los 557 reclutados, así como en función del género.

Tabla 4.9 - Parámetros bioquímicos (X ± DT)

	Total	Hombres	Mujeres	<i>p</i>	Valores Referencia	
	(n = 447)	(n = 122)	(n = 325)		Hombres	Mujeres
Glucosa (mg/dl)	87.19 ± 12.80	88.58 ± 16.94	86.77 ± 10.92	0.0874	74-115 ¹	74-115 ¹
Colesterol total (CT) (mg/dl)	200.57 ± 36.46	194.77 ± 38.67	202.75 ± 35.42	0.2460	<200 ¹	<200 ¹
Colesterol HDL (mg/dl)	55.09 ± 14.23	46.57 ± 10.84	58.34 ± 14.04	<0.0001	>40 ¹	>50 ¹
Colesterol LDL (mg/dl)	126.51 ± 30.64	126.77 ± 32.68	126.41 ± 29.87	0.0872	<160 ¹	<160 ¹
Triglicéridos (mg/dl)	97.68 ± 47.49	103.39 ± 50.34	95.53 ± 46.27	0.3031	<150 ¹	<150 ¹
Cociente CT/HDL	3.89 ± 1.16	4.43 ± 1.30	3.69 ± 1.03	<0.0001	<4.5 ²	<4 ²
Cociente LDL/HDL	2.46 ± 0.90	2.87 ± 0.99	2.3 ± 0.81	<0.0001	<3 ²	<2.5 ²
ASAT UI/l	20.10 ± 6.15	22.9 ± 7.18	19.03 ± 5.35	0.0001	<31 ¹	<31 ¹
ALAT UI/l	20.89 ± 13.15	26.99 ± 17.60	18.57 ± 10.11	<0.0001	<34 ¹	<34 ¹
Uratos (mg/dl)	5.05 ± 1.31	6.46 ± 1.20	4.56 ± 0.95	<0.0001	2.6-6.0 ¹	2.6-6.0 ¹
Creatinina (mg/dl)	0.87 ± 0.16	1.02 ± 0.16	0.81 ± 0.13	<0.0001	0.7-1.1 ¹	0.7-1.1 ¹
Vitamina D (ng/ml)	25.06 ± 9.92	22.51 ± 9.53	25.91 ± 9.94	0.0818	15-100 ¹	15-100 ¹
APOA1 (mg/dl)	153.77 ± 30.05	139.15 ± 24.13	158.06 ± 30.33	0.0017	120-180 ¹	120-180 ¹
APOB (mg/dl)	110.34 ± 27.59	122.33 ± 29.80	106.82 ± 25.99	0.0009	63-110 ¹	63-110 ¹
Cociente APOB/APOA1	0.74 ± 0.23	0.9 ± 0.26	0.7 ± 0.20	0.0009	0.9 ²	0.8 ²

p, valor de comparación entre los grupos, 0.05 para considerarse diferencia estadísticamente significativa.
El análisis se ha realizado teniendo en cuenta la variable de confusión edad.
¹ Fuente: Valores de referencia del laboratorio clínico del Hospital Universitario La Paz, 2011.
² Fuente: ²⁰⁴.

Los resultados sobre la clasificación en función de los niveles de glucemia, han mostrado un mayor el número de población masculina con niveles elevados (17.90 %) que la población femenina (9.40 %), encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres ($p = 0.0036$)

Con respecto a la clasificación en función de los niveles de colesterol total, el 48.99 % de la población estudiada ha mostrado valores de colesterol plasmático mayores a 200 mg/dl (45.90 % sobre el total de los hombres y 50.20% sobre el total de las mujeres) no existiendo diferencias significativas entre ambos grupos $p = 0.7307$.

Los resultados sobre la clasificación en función de los niveles de colesterol HDL, han mostrado un 32.50 % de hombres y mujeres con niveles menores a los recomendados. En el caso de la clasificación de los niveles de colesterol LDL un 13.00 % del total de la población masculina ha

presentado niveles elevados, y un 15.40 % en el caso del total de la población femenina. No se han encontrado diferencias significativas entre género.

De acuerdo a los cocientes colesterol total/HDL colesterol y el cociente LDL/HDL colesterol (marcadores de riesgo cardiovascular), se ha observado que el 42.20 % de población masculina y un 35.70 % de población femenina ha presentado por encima de los límites recomendados, existiendo diferencias significativas entre género ($p = 0.0297$). En el caso de LDL/HDL el 44.80 % de población masculina y un 30.30 % de población femenina ha presentado estos niveles por de los valores recomendados, existiendo diferencias significativas entre género ($p = 0.0008$).

Con respecto a la clasificación en función de los niveles de vitamina D en suero, la mayoría de la población tanto hombres como mujeres (75.00 %), se encuentran en un grado de deficiencia de este micronutriente. No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres con respecto a dicha clasificación.

4.1.2 RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA

La caracterización genotípica de la población de la Plataforma “Cantoblanco” de Genómica Nutricional y Alimentación se ha realizado seleccionando 64 SNPs, de las 122 variantes totales, pertenecientes a 41 genes: 7 involucrados en procesos inflamatorios, 10 en metabolismo lipídico, 14 relacionados con obesidad y 10 con enfermedades cardiovasculares.

En la tabla 4.10 se muestra la distribución genotípica, las frecuencias alélicas y los resultados del análisis de *Hardy-Weinberg* para 480 sujetos (124 hombres, y 356 mujeres), que finalmente se genotiparon, del total de 557 reclutados.

Tabla 4.10 – Características genotípicas de las variantes genéticas seleccionadas

Gen	Símbolo	dbSNP ID	Funcionalidad	Genotipo			Alelo Minoritario (%)	Equilibrio de <i>Hardy-Weinberg</i> <i>p</i> -Valor
Genes relacionados con la obesidad								
Adenosina deaminasa específica de RNA,2	ADARB2	rs2805533	<i>intron</i>	28.57	47.91	23.52	47.47	0.4424
Adiponectina	ADIPOQ	rs1501299	<i>intron</i>	55.46	38.98	5.57	25.06	0.4841
		rs266729	<i>near gene 5´</i>	56.46	38.32	5.22	24.38	0.4696
		rs17300539	<i>nearGene-5</i>	80.97	18.14	0.88	9.96	0.9585
		rs2241766	<i>cds-synon</i>	69.33	27.33	3.33	1.70	0.6000
		rs182052	<i>intron</i>	41.98	46.15	11.87	34.95	0.8073
		Proteína de susceptibilidad a cáncer de mama tipo 2	BRCA2	rs144848	<i>missense</i>	49.54	38.66	11.81
Proteína implicada en la regulación de los ritmos circadianos	CLOCK	rs1801260	<i>UTR 3´</i>	54.24	39.73	6.03	25.89	0.5166
		rs3749474	<i>UTR-3</i>	46.45	42.33	11.21	32.38	0.5415
		rs4580704	<i>intron</i>	37.77	45.85	16.38	39.3	0.4474
Proteína asociada con la obesidad y masa grasa	FTO	rs9939609	<i>intron</i>	36.11	46.83	17.07	40.48	0.5957
		rs8050136	<i>intron</i>	36.49	44.82	18.69	41.10	0.1358
Glucagón	GCG (GLP1)	rs4664447	<i>intron</i>	94.91	4.65	0.44	2.77	0.0409
Grelina	GHRL	rs4684677	<i>missense</i>	91.47	7.66	0.88	4.70	0.0088
		rs2075356	<i>intron</i>	81.50	18.28	0.22	9.36	0.1629
Polipeptido inhibidor gástrico	GIP	rs2291726	<i>intron</i>	32.95	44.85	22.20	44.62	0.0628
Lactasa	LCT (MCM6)	rs4988235	<i>intron</i>	66.13	33.87	0	16.93	0.0002
Receptor de leptina	LEPR	rs8179183	<i>missense</i>	67.57	30.16	2.27	17.35	0.3448
		rs1137100	<i>missense</i>	61.36	32.27	6.36	22.5	0.1463
		rs1137101	<i>missense</i>	35.11	48.67	16.22	40.56	0.8994
Receptor de la melanocortina 4	MC4R	rs12970134	<i>ND</i>	59.63	35.09	5.28	22.82	0.9634
Neuropéptido Y	NPY	rs16147	<i>near gene 5´</i>	27.13	50.77	22.10	47.48	0.7543

Gen	Símbolo	dbSNP ID	Funcionalidad	Genotipo			Alelo Minoritario (%)	Equilibrio de Hardy-Weinberg p-Valor
Neuropéptido Y	NPY	rs5574	<i>cds-synon</i>	29.89	50.99	19.12	44.62	0.5444
Perilipina 1	PLIN1	rs1052700	<i>UTR-3</i>	44.32	43.01	12.66	34.17	0.39
Proopiomelanocortina	POMC	rs6713532	<i>intron</i>	54.92	38.51	6.56	25.82	0.9732
		rs2071345	<i>cds-synon</i>	99.34	0.66	0	0.33	1*
Genes relacionados con la enfermedad cardiovascular								
Receptor de estrógenos 1	ESR1	rs2234693	<i>intron</i>	29.17	49.12	21.71	46.27	0.8508
		rs9340799	<i>intron</i>	38.86	45.23	15.91	38.52	0.3841
Receptor de estrógenos 2	ESR2	rs1256049	<i>cds-synon</i>	91.89	7.24	0.88	04.5	0.0046
Proteína reguladora de la glucoquinasa	GCKR	rs780094	<i>intron</i>	34.37	45.23	20.40	43.02	0.1164
Subunidad beta de la proteína G 3	GNB3	rs2301339	<i>intron</i>	41.89	43.24	14.86	36.49	0.1825
		rs5443	<i>cds-synon</i>	40,77	44,37	14.86	37.05	0.3418
Metilen-tetrahidrofolatoredutasa	MTHFR	rs1801133	<i>missense</i>	37.92	45.15	16.93	39.5	0.2751
Óxido nítrico sintasa u óxido nítrico sintasa endotelial	NOS3 (eNOS)	rs1799983	<i>missense</i>	40.54	44.14	15.32	37.39	0.2601
Lipoproteínas de baja densidad oxidadas	ORL1/LOX-1	rs3736235	<i>intron</i>	28.17	45.41	26.42	49.13	0.0592
Periodo circadiano 2	PER2	rs4663302	<i>ND</i>	45.61	39.69	14.69	34.54	0.0114
		rs2304672	<i>UTR 5</i>	84.58	14.51	0.91	08.16	0.7006
		rs934945	<i>missense</i>	68.89	27.42	3.69	17.4	0.415
Paraoxonasa 1	PON1	rs662	<i>missense</i>	52.94	37.69	9.37	28.21	0.1621
Inhibidor del activador del plasminógeno-1	SERPINE1 (PAI1)	rs6092	<i>missense</i>	83.81	15.14	1.04	08.62	0.6487
Genes involucrados en procesos inflamatorios								
Proteína C reactiva	CRP	rs1130864	<i>UTR 3´</i>	46.17	45.30	8.53	31.18	0.2717
		rs1800947	<i>cds-synon</i>	88.84	10.94	0.22	5.69	0.9461
Interferon gamma inducible 30	IFI30	rs11554159	<i>missense</i>	54.44	38.44	7.11	26.33	0.9205
Interleuquina 6	IL6	rs1800797	<i>near gene 5´</i>	44.65	43.96	11.39	33.37	0.875

Gen	Símbolo	dbSNP ID	Funcionalidad	Genotipo			Alelo Minoritario (%)	Equilibrio de Hardy-Weinberg <i>p</i> -Valor
Interleuquina B1	ILB1	rs1143623	<i>nearGene-5</i>	55.97	40.49	3.54	23.78	0.0175
Selectina E	SELE	rs5368	<i>missense</i>	81.32	18.24	0.44	09.56	0.3554
Factor de necrosis tumoral α	TNF – α	rs1800629	<i>near gene 5'</i>	81.22	17.90	0.87	09.83	0.9573
		rs1799724	<i>nearGene-5</i>	75.88	23.45	0.66	12.39	0.13
Superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral miembro 1A	TNFRSF1A	rs767455	<i>cds-synon</i>	42.89	44.89	12.22	34.67	0.9093
Genes involucrados en el metabolismo lipídico								
Transportador dependiente de la unión de ATP	ABCA1	rs2575875	<i>intron</i>	37.56	45.11	17.33	39.89	0.2365
		rs4149272	<i>intron</i>	38.79	42.83	18.39	3.98	0.03
		rs2230806	<i>missense</i>	52.65	38.72	8.63	27.99	0.4552
Apolipoproteína B	APOB	rs512535	<i>nearGene-5</i>	27.21	51.55	21.24	47.01	0.5051
Apolipoproteína B	APOB	rs693	<i>cds-synon</i>	28.26	51.21	20.53	46.14	0.5638
Apolipoproteína E	APOE	rs429358	<i>missense</i>	81.5	17.4	1.1	9.80	0.913
		rs7412	<i>missense</i>	88.21	11.35	0.44	6.11	0.8709
		rs405509	<i>near gene 5</i>	26.76	49.21	24.04	48.64	0.8044
Proteína de unión a ácidos grasos 2	FABP2	rs1799883	<i>missense</i>	55.51	36.85	7.64	26.07	0.4085
Lipasa hepática	LIPC	rs1800588	<i>nearGene-5</i>	61.00	31.75	7.26	23.13	0.0322
Lipoproteína Lipasas	LPL	rs328	<i>STOP-GAIN</i>	76.73	21.92	1.34	12.30	0.8824
Receptores activadores de la proliferación de peroxisomas α	PPARA	rs135549	<i>intron</i>	33.49	48.60	17.91	42.21	0.9802
Receptores activadores de la proliferación de peroxisomas	PPARG	rs3856806	<i>cds-synon</i>	79.78	18.02	2.20	11.21	0.0709
		rs1801282	<i>missense</i>	81.57	17.05	1.38	9.91	0.4886
Receptor de las lipoproteínas de alta densidad HDL	SCARB1	rs4238001	<i>missense</i>	70.55	27.08	2.38	15.91	0.926
ND, dato no disponible. * El valor ha sido calculado mediante el test exacto debido a que el número de heterocigotos y homocigotos variantes ha sido muy reducido y la <i>p</i> no era representativa. El resto de datos han sido analizados mediante el test χ^2 ($p > 0.05$).								

Las distribuciones genotípicas de las variantes rs1143623 ILB1 ($p = 0.0175$), rs4149272 ABCA1 ($p = 0.03$), rs1800588 LIPC ($p = 0.0322$), rs144848 BRCA2 ($p = 0.05$), rs4664447 GCG (GLP1) ($p = 0.0409$), rs4684677 GHRL ($p = 0.0088$), rs4988235 LCT (MCM6) ($p = 0.0002$), rs1256049 ESR2 ($p = 0.0046$), rs4663302 PER2 ($p = 0.0114$), se han desviado del equilibrio de *Hardy-Weinberg* ($p < 0.05$).

Los polimorfismos que se muestran en la tabla 4.11, se encuentran en desequilibrio de ligamiento.

Tabla 4.11 - Variantes genéticas estudiadas en desequilibrio de ligamiento				
Gen	Símbolo	Variante 1	Variante 2	Desequilibrio Ligamiento
Transportador dependiente de la unión de ATP	ABCA1	rs2575875	rs4149272	0.88
Receptor de estrógenos 1	ESR1	rs2234693	rs9340799	0.72
Proteína asociada con la obesidad y masa grasa	FTO	rs9939609	rs8050136	0.94
Subunidad beta de la proteína G 3	GNB3	rs2301339	rs5443	0.97
Neuropéptido Y	NPY	rs16147	rs5574	0.87
Se ha considerado desequilibrio de ligamiento cuando el resultado del equilibrio ha sido superior a 0.70.				

4.2 ESTUDIO DE ASOCIACIÓN FENOTIPO-GENOTIPO EN LA POBLACIÓN DE LA PLATAFORMA CANTOBLANCO

4.2.1 ASOCIACIÓN DE LAS VARIANTES GENÉTICAS ESTUDIADAS CON LOS ESTILOS DE VIDA

Se ha observado una asociación estadísticamente significativa entre el polimorfismo rs780094 perteneciente al gen que codifica a la proteína reguladora de la glucoquinasa (GCKR), enzima clave en la homeostasis de la glucemia en el organismo debido a su función de unión a la glucosa, y las veces que la población estudiada realiza actividad física ($p < 0.0044$). Los datos revelan que la mayoría de la muestra portadora del genotipo homocigoto común (61.70 %) no realizan a la semana ningún tipo de actividad física, frente los homocigotos variantes entre los que el porcentaje de sedentario resultó mucho menor (14.00 %). La mayoría de los heterocigotos variantes, por tanto, realiza al menos algún tipo de actividad física una vez por semana. No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre sexo.

En la figura 4.10 se muestran los porcentajes de la población clasificada según las veces que realiza actividad física en función del genotipo en base al modelo aditivo. Así, se puede ver que la presencia del alelo minoritario presenta una mayor probabilidad de realizar ejercicio físico en comparación con los portadores genotipo homocigoto común (OR : 1.83, $IC95$ %: 1.35-2.49).

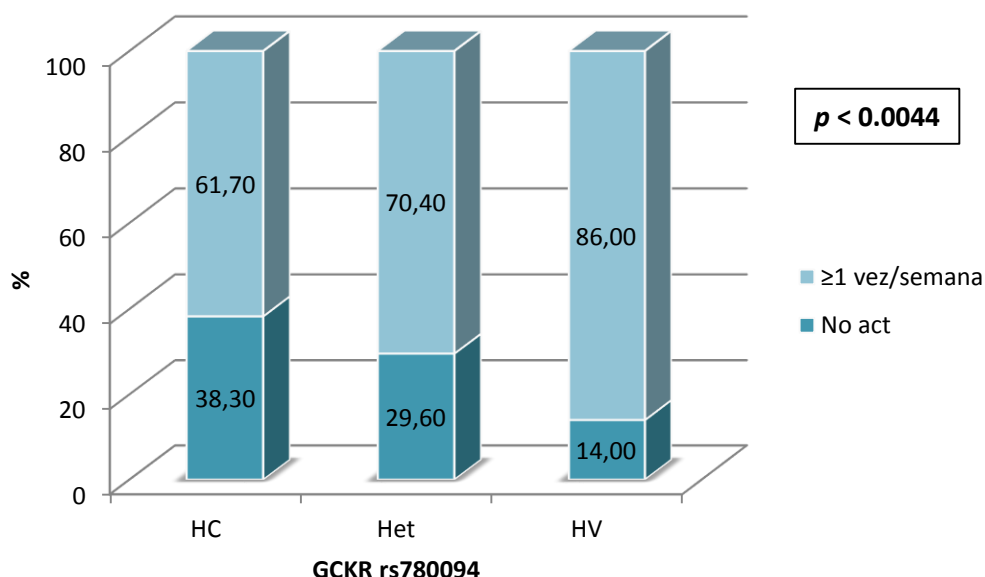


Figura 4.10- Porcentaje de la población clasificada según las veces que realiza actividad física en función del genotipo según el modelo aditivo. p valor ajustado por 64 SNPs.

En el resto del análisis sobre aspectos relacionados con los estilos de vida no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas ni para el total de la población, ni en función del sexo.

4.2.2 ASOCIACIÓN DE LAS VARIANTES GENÉTICAS ESTUDIADAS CON LAS MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS Y DE CONSTANTES VITALES

Con respecto a las medidas antropométricas se ha encontrado una asociación estadísticamente significativa entre el índice de la cintura-cadera y el polimorfismo rs3856806 perteneciente al gen *PPAR γ* , que codifica a los receptores activados por proliferadores de los peroxisomas *gamma* implicados en el almacenamiento de ácidos grasos y en el metabolismo de la glucosa ($p = 0.0288$). En concreto, como se puede ver en la tabla 4.12, se ha observado que, mediante el modelo aditivo, los portadores del genotipo homocigoto común presentan menor índice cintura-cadera con una media de 0.82 cm (DT: 0.09) con respecto a los

heterocigotos 0.84 (DT: 0.08), y estos a su vez con respecto a los homocigotos variantes con una media de 0.89 (DT: 0.09) con un efecto β de 0.03 y un IC95 %: 0.01 - 0.04.

Tabla 4.12 - Índice cintura - cadera según el genotipo, conforme al modelo aditivo (X ± DT)							
Parámetro	Gen	Variante Genética	Homocigoto Común	Heterocigoto	Homocigoto variante	<i>p</i> Aj	<i>p</i> Int. Aj
Índice cintura-cadera	PPAR γ	Total	0.82 (0.09)	0.84 (0.08)	0.89 (0.09)	0.0288	1
		rs3856806 Hombres	0.88 (0.08)	0.89 (0.07)	0.92 (ND)	1	1
		Mujeres	83.54 (13.32)	88.73 (14.71)	91.53 (19.84)	0.3570	1
<i>p</i> Aj, <i>p</i> valor de asociación de la variante genética sobre el parámetro estudiado, ajustado por 64 SNPs. <i>p</i> Int. Aj, <i>p</i> valor de interacción para el polimorfismo y el sexo sobre el parámetro estudiado, ajustado por 64 SNPs. Se consideraron que existían diferencias estadísticamente significativas cuando el <i>p</i> valor era menor de 0.05. El análisis se ha realizado teniendo en cuenta las variables de confusión sexo y edad en la asociación, y edad en el caso de la interacción. ND, dato no disponible							

En el resto del análisis sobre aspectos relacionados con los parámetros antropométricos no han resultado estadísticamente significativos ni para el total de la población, ni en función del sexo.

4.2.3 ASOCIACIÓN DE VARIANTES GENÉTICAS ESTUDIADAS CON LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

Con respecto a los parámetros bioquímicos, en la población de estudio se ha observado una asociación entre la clasificación de los niveles totales de colesterol y el polimorfismo rs1800588 perteneciente al gen que codifica para la lipasa hepática (LIPC), de manera que el 64.00 % de los portadores del genotipo homocigoto variante, han presentado niveles de colesterol total elevados, a diferencia de los heterocitogos (58.9 %) y los homocigotos comunes (43.70 %), según el modelo aditivo ($p = 0.013$). De esta manera, a mayor cantidad de alelos minoritarios, se presenta un mayor riesgo de tener niveles de colesterol por encima de los valores de referencia, en comparación con los portadores del genotipo homocigoto común (OR: 2.06, IC95 %: 1.39 - 3.04).

En la figura 4.11 se muestra el porcentaje de población clasificada según los niveles de colesterol total en función del genotipo según el modelo aditivo.

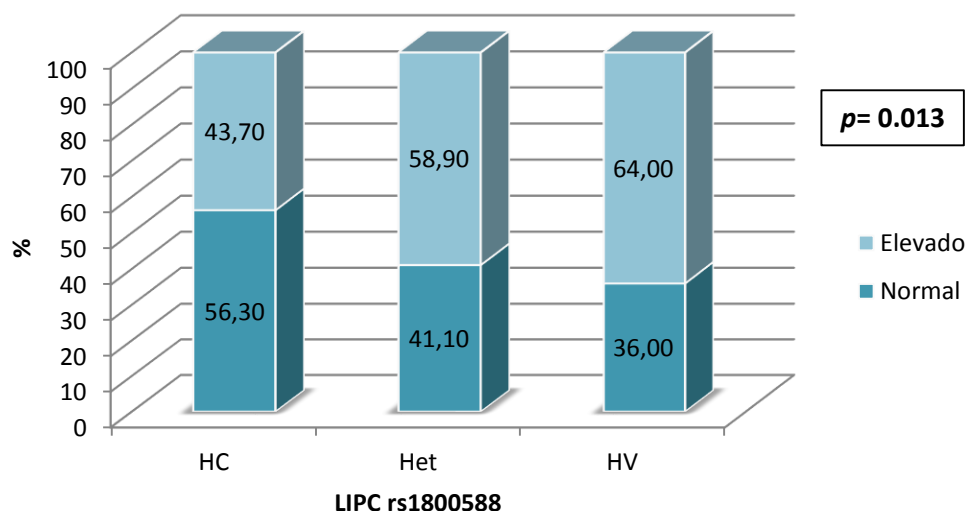


Figura 4.11 - Porcentaje de la población clasificada según niveles de colesterol total en sangre en función del genotipo según el modelo aditivo. p valor ajustado por 64 SNPs.

Con respecto a los niveles de colesterol HDL, para esta misma variante, los resultados presentan unos niveles mayores, en función del número de alelos minoritarios presentes, según el modelo aditivo ($p = 0.0475$). En la interpretación del efecto, los resultados han mostrado que los portadores del genotipo variante (TT) muestran niveles más elevados con respecto al genotipo heterocigoto y aún más con respecto a los portadores del genotipo homocigoto común (β : 2.29, IC95 %: 0.03 - 4.55).

No se han encontrado diferencias significativas entre sexos en la asociación sobre el colesterol total ni HDL.

En el caso de las variantes rs429358 y rs7412 pertenecientes al gen que codifica para la apolipoproteína E (APOE), el análisis conjunto de estos dos polimorfismos presenta tres principales isoformas (E2, E3 y E4), codificadas por tres alelos ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ y $\epsilon 4$) y que constituyen seis genotipos ($\epsilon 2\epsilon 2$, $\epsilon 2\epsilon 3$, $\epsilon 2\epsilon 4$, $\epsilon 3\epsilon 3$, $\epsilon 3\epsilon 4$ y $\epsilon 4\epsilon 4$). Como se puede ver en la figura 4.12, dónde se representan los valores medios de los cocientes CT/HDL y LDL/HDL, para cada uno de los genotipos (CT/HDL $p = 0.0012$ y LDL/HDL $p < 0.0001$) y alelos (CT/HDL $p < 0.0001$ y LDL/HDL $p < 0.0001$), se observa un incremento a medida que los genotipos portan mayor número de alelos $\epsilon 4$ y disminuyen los $\epsilon 2$, resultado este incremento más marcado en el caso del cociente LDL/HDL. En el caso de los parámetros bioquímicos por separado (CT, LDL), han mostrado un comportamiento similar, igualmente tanto en genotipos (CT $p = 0.015$ y LDL $p < 0.0001$) como en los alelos (CT $p = 0.0083$ y LDL $p < 0.0001$).

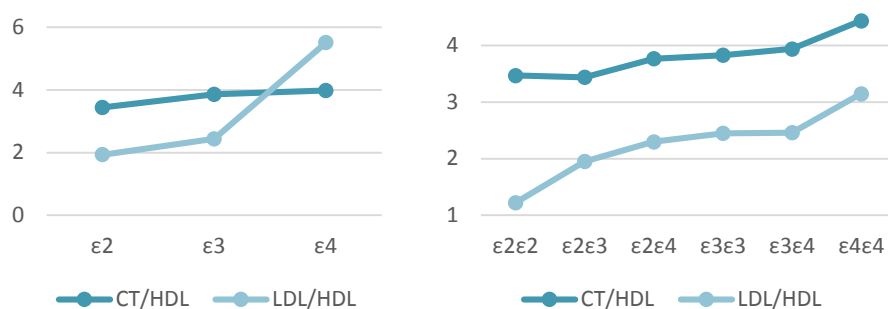


Figura 4.12 - Valores medios de los cocientes CT/HDL y LDL/HDL en función de los alelos e isoformas de APOE.

En el caso del alelo $\epsilon 2$, el efecto provocado en los portadores revela una disminución estadísticamente significativa del CT (β : -17.31, IC 95 %: -28.48 - -6.13, $p = 0.0025$), LDL (β : -24.26, IC 95%: -33.75 - -14.77, $p < 0.0001$), CT/HDL (β : -0.63, IC 95%: -0.9 - -0.37, $p < 0.0001$) y LDL/HDL (β : -0.66, IC 95%: -0.99 - -0.32, $p < 0.0001$), en comparación con el alelo $\epsilon 3$. En el caso del alelo $\epsilon 4$, aunque no se han generado aumentos significativos con respecto a los portadores del alelo $\epsilon 3$, en el caso del genotipo $\epsilon 4\epsilon 4$ LDL y CT/HDL, sí que se han observado aumentos estadísticamente significaditos en comparación con el genotipo $\epsilon 3\epsilon 3$. Estos valores han quedado representados en la tabla 4.13.

Tabla 4.13 - Niveles de colesterol total LDL, CT/HDL y LDL/HDL en función de los polimorfismos de APOE*

(n = 447) %	β Colesterol Total Media (mg/dl) IC 95 (%)	p	β LDL Media (mg/dl) IC 95 (%)	p	β CT/HDL Media (IC 95 %)	p	β LDL/HDL Media (IC 95 %)	p
$\epsilon 2\epsilon 2$ (0.26)	-51.78 (-114.03 - 10.47)	0.1000	-87.87 (-137.87 - -37.88)	0.0006	-1.89 (-3.28 - -0.51)	0.0075	50.37 (-37.12 - 137.87)	0.2600
$\epsilon 2\epsilon 3$ (9.28)	-16.28 (-27.59 - -4.98)	0.0049	-22.55 (-32.04 - -13.06)	<0.0001	-0.60 (-0.87 - -0.34)	<0.0001	2.85 (-13.26 - 18.96)	0.7300
$\epsilon 2\epsilon 4$ (2.06)	4.42 (-19.31 - 28.15)	0.7100	-3.51 (-22.58 - 15.55)	0.7200	-0.17 (-0.69 - 0.36)	0.5400	24.15 (-9.21 - 57.5)	0.1600
$\epsilon 3\epsilon 3$ (70.10)	1		1		1		1	
$\epsilon 3\epsilon 4$ (17.01)	-1.06 (-9.74 - 7.62)	0.8100	0.74 (-6.45 - 7.93)	0.8400	0.06 (-0.14 - 0.26)	0.5800	-3.19 (-15.55 - 9.18)	0.6100
$\epsilon 4\epsilon 4$ (1.29)	25.20 (-2.71 - 53.1)	0.0770	31.04 (8.62 - 53.45)	0.0068	0.64 (0.01 - 1.26)	0.0450	4.94 (-34.28 - 44.16)	0.8000
$\epsilon 2$ (9.54)	-17.31 (-28.48 - -6.13)	0.0025	-24.26 (-33.75 - -14.77)	<0.0001	-0.66 (-0.99 - -0.32)	0.0001	-0.63 (-0.9 - -0.37)	<0.0001
$\epsilon 3$ (72.16)	1		1		1		1	
$\epsilon 4$ (18.30)	0.79 (-7.62 - 9.2)	0.8500	3.28 (-3.74 - 10.31)	0.3600	0.18 (-0.07 - 0.42)	0.1500	0.11 (-0.09 - 0.3)	0.2700
Efecto del polimorfismo sobre el perfil lipídico tomando como referencia el alelo $\epsilon 3$ y el genotipo $\epsilon 3\epsilon 3$. $p < 0.05$								

Por otro lado, en el caso de la variante rs328 perteneciente al gen que codifica la lipoproteína lipasa (LPL), se ha observado también una asociación con respecto a la clasificación de triglicéridos en sangre, de manera que el 3.20 % de los portadores del genotipo heterocigoto y homocigoto variante han presentado niveles de triglicéridos anormales, a diferencia del 16.40 % en el caso de los homocigotos comunes, según el modelo dominante ($p = 0.0033$. OR: 0.18, IC95 %: 0.05-0.60).

En la figura 4.13 se muestra el porcentaje de población clasificada según los niveles de triglicéridos en función del genotipo en base al modelo dominante. No se han encontrado diferencias significativas entre sexos.

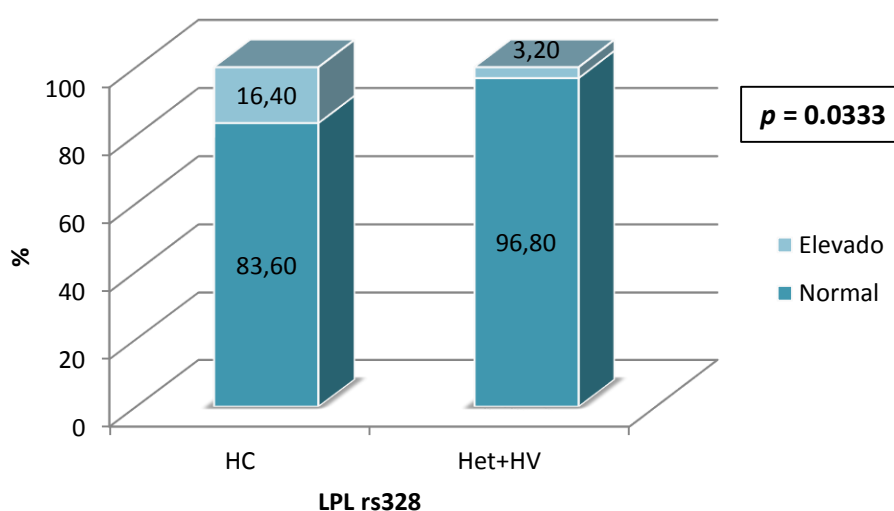


Figura 4.13 - Porcentaje de la población clasificada según niveles de triglicéridos en sangre en función del genotipo según el modelo dominante. p valor ajustado por 64 SNPs.

Con respecto a la clasificación de niveles de vitamina D en sangre se ha observado una asociación con el polimorfismo rs767455 TNFRSF1 α , que codifica a la súperfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral miembro 1 alfa y participa en la regulación de los receptores de citoquinas, de manera que niveles insuficientes de vitamina D en sangre se han presentado en mayor proporción en los portadores del genotipo homocigoto común (91.30 %), en comparación con los portadores del genotipo heterocigoto (67.70 %) y los portadores del genotipo homocigoto variante (52.90 %) según el modelo aditivo ($p = 0.0189$. OR: 0.31, IC95 %: 0.15-0.61).

En la figura 4.14 se muestra el porcentaje de población clasificada según los niveles de vitamina D en sangre, en función del genotipo según el modelo dominante. No se han encontrado diferencias significativas entre sexos.

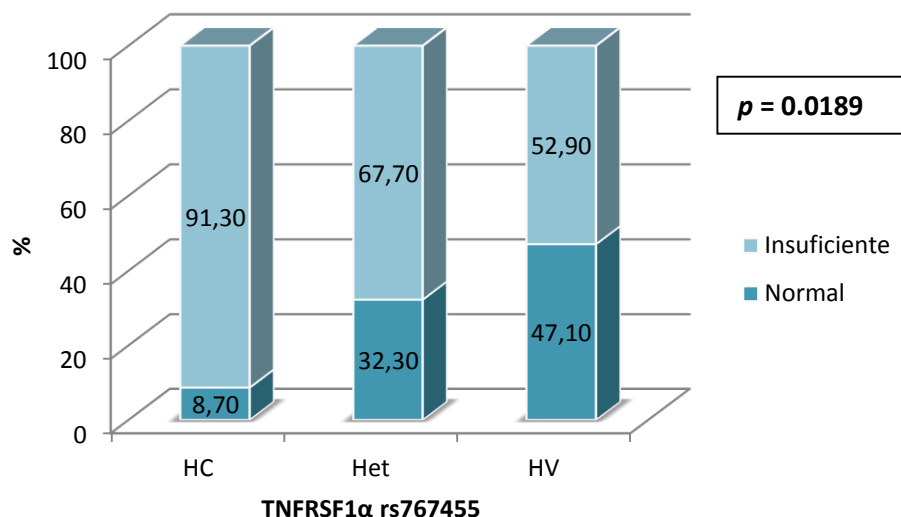


Figura 4.14 - Porcentaje de la población clasificada según la vitamina D en sangre en función del genotipo según el modelo aditivo. p valor ajustado por 64 SNPs.

En el resto del análisis sobre aspectos relacionados con los parámetros bioquímicos no han resultado estadísticamente significativos ni para el total de la población, ni en función del sexo.

4.2.4 INTERACCIÓN DE LAS VARIANTES GENÉTICAS ESTUDIADAS CON NUTRIENTES Y ALIMENTOS CONSUMIDOS

El análisis de interacción de las variables genéticas en función de los nutrientes y la alimentación, se ha realizado en aquellas variantes genéticas seleccionadas con bibliografía previa sobre interacciones. De todas las variables analizadas, únicamente se encontró una asociación del polimorfismo rs3749474 CLOCK con el índice cintura-cadera en función del grado de apetito presentado.

De los análisis de interacción realizados sobre el modelo aditivo, se han encontrado resultados significativos en el análisis ajustado (81 ajustes), que relacionan la variante rs3749474 CLOCK, con el índice cintura-cadera en función del grado de apetito ($p = 0.0289$).

En la tabla 4.14 y figura 4.15 se muestran los valores del cociente cintura-cadera en función del genotipo estudiado y mediante la estratificación según el grado de apetito.

Tabla 4.14 - Índice cintura-cadera según el genotipo del rs3749474 CLOCK estratificado por el grado de apetito (X ± DT)				
		Poco apetito	Apetito medio	Mucho apetito
	n	(n = 27)	(n=172)	(n=220)
Homocigoto Común	192	85.8636 ± 15.7672	85.0942 ± 14.2226	89.4226 ± 13.45140
Heterocigoto	179	75.3308 ± 12.6378	82.8015 ± 10.7931	91.0640 ± 14.4851
Homocigoto Variante	48	69.0000 ± 0.000	81.1000 ± 12.2850	95.3519 ± 18.2688

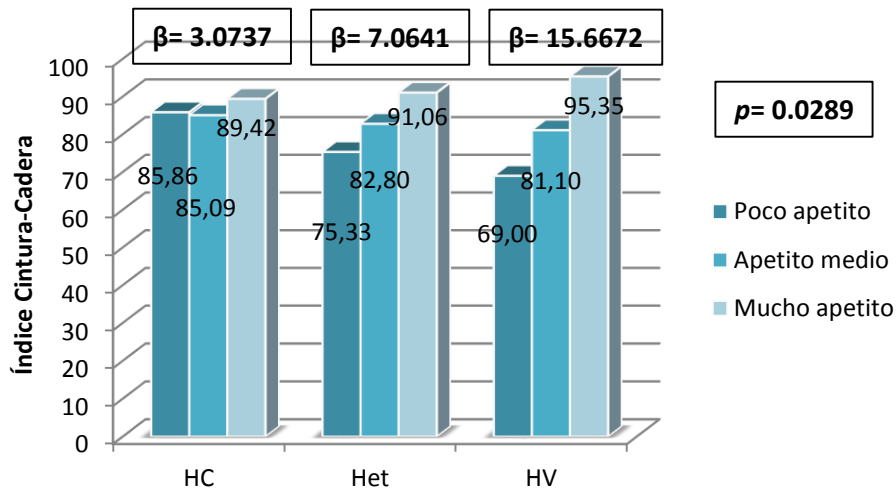


Figura 4.15 - Media del índice circunferencia-cintura en función del polimorfismo rs3749474 CLOCK y el grado de apetito.

En la tabla 4.15 se muestra la interpretación del análisis, dónde se representa el aumento del índice cintura-cadera, en función del grado de apetito, con respecto a los diferentes genotipos, y se puede ver como los portadores del genotipo variante (TT) rs3749474 CLOCK, aumentan en 15 cm el índice cintura-cadera conforme aumenta su grado de apetito, a diferencia de los homocigotos comunes (CC) que aumentan en 3 unidades.

Tabla 4.15 - Aumento esperado del índice cintura-cadera, en función del grado de apetito con respecto a los diferentes genotipos			
Genotipo	n	β	(IC 95 %)
Homocigoto Común	192	3.0734	0.3194-5.8274
Heterocigoto	179	7.0641	4.3120-9.8161
Homocigoto Variante	48	15.6672	7.8773-23.4570

4.3 ANALISIS DE LAS INTERACCIONES GEN-DIETA ENTRE MARCADORES GENÉTICOS Y DETERMINADOS COMPONENTES DE LOS ALIMENTOS MEDIANTE ENSAYOS NURIGENETICOS DE INTERVENCIÓN

4.3.1 “IDENTIFICACIÓN DE SNPs IMPLICADOS EN LA DIFERENTE RESPUESTA A UNA LECHE ENRIQUECIDA CON ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3, Y EL PERFIL LIPIDICO DE LA LECHE”

Para la realización de este estudio, se ha partido de un proyecto de investigación previo desarrollado en el Departamento de Nutrición y Salud *Biosearch* S.A. en Granada, en el cual se seleccionaron un total de 297 voluntarios de entre 25 a 65 años con riesgo cardiovascular moderado, con el objetivo de evaluar el efecto del consumo una leche enriquecida con ácidos grasos omega 3, ácido oleico, vitaminas y ácido fólico. Se trató de un estudio de intervención de 12 meses de duración con tres grupos de tratamiento: un grupo que consumió 500 ml/día de leche enriquecida (n=136), otro leche semidesnatada (n=85) y un tercer grupo, de leche desnatada (n=76) ²³⁷.

Los resultados del estudio previo, concluyeron que el consumo de leche enriquecida con omega 3, ácido oleico, vitaminas y ácido fólico mejoró el estado nutricional así como los marcadores de riesgo cardiovascular en los voluntarios que consumieron este tipo de bebida, resultado que no se obtuvo en los consumidores de leche semidesnatada y desnatada ²³⁷.

Obtenidos estos resultados, el objetivo en IMDEA Alimentación, ha sido determinar si la población, categorizada de acuerdo a su de perfil genético, puede beneficiarse más de una leche que otra, debido a la diferente respuesta interindividual a la dieta provocada por el condicionante genético.

Para ellos, de la selección inicial de 122 SNPs y 52 genes, se ha realizado una sub-selección de 14 SNPs pertenecientes a 9 genes. La sub-selección se realizó teniendo en cuenta que los mismos se encuentran involucrados en rutas del metabolismo lipídico, así como del metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados y relacionados en el proceso inflamatorio. Las variantes genéticas seleccionadas pertenecen a genes con cuya modificación puede desembocar en alteraciones de rutas metabólicas relacionadas con el riesgo cardiovascular, ya que actúan como importantes precursores de lípidos moduladores de la señalización celular, sobre la expresión génica y procesos inflamatorios.

En este estudio se han realizado dos tipos de análisis: uno enfocado a estudiar la influencia genética sobre la respuesta al consumo de leche enriquecida con ácidos grasos omega-3, y otro enfocado a estudiar la influencia genética sobre la respuesta al consumo de grasa láctea. A continuación, se presentan los resultados de cada estudio.

4.3.1.1 *Análisis de la diferente respuesta sobre la reducción de riesgo cardiovascular mediada por el consumo de leche enriquecida en omega-3, en función de las distintas variantes genéticas.*

Este análisis se ha realizado en 175 sujetos del total de 297, que es el número de participantes del que se recogieron los datos principio y fin, englobados en el grupo de consumo de leche enriquecida (n=90) y semidesnatada (n=85). Dichos participantes, con riesgo cardiovascular elevado, sometidos al estudio de intervención consumieron durante 12 meses 500 ml/día de leche enriquecida o semidesnatada en función del grupo.

La tabla 4.16 resume los principales resultados obtenidos de los parámetros bioquímicos analizados tras las 12 semanas de consumo y los diferentes tipos de leche ingerida.

	Grupo	Tiempo 0 Media (IC 95 %)	Tiempo 12 Media (IC 95 %)	p- tiempo	p- leche	p- tiempo*leche
IMC (Kg/m ²)	E	29.46 (28.43 - 30.49)	29.55 (28.55 - 30.56)	0.0834	0.0551	0.2232
	S	28.08 (27.14 - 29.02)	28.47 (27.49 - 29.46)			
TC (mg/dL)	E	217.57 (209.8 - 225.34)	208.24 (201.06 - 215.41)	0.0970	0.2997	0.0008
	S	218.54 (211.17 - 225.91)	223.68 (216.3 - 231.07)			
HDL (mg/dL)	E	43.81 (41.45 - 46.17)	45.52 (42.64 - 48.39)	0.9383	0.2987	0.0334
	S	44.5 (41.92 - 47.08)	44.45 (41.55 - 47.34)			
LDL (mg/dL)	E	145.89 (138.6 - 153.19)	137.71 (131.3 - 144.11)	0.4754	0.3388	0.0037
	S	143.27 (135.46 - 151.08)	147.59 (138.7 - 156.49)			
TC/HDL	E	5.25 (4.94 - 5.56)	4.88 (4.59 - 5.16)	0.2605	0.2851	< 0.0001
	S	5.19 (4.9 - 5.48)	5.43 (5.06 - 5.79)			
LDL/HDL	E	3.53 (3.27 - 3.79)	3.26 (3.02 - 3.5)	0.6503	0.2730	0.0018
	S	3.41 (3.16 - 3.66)	3.55 (3.25 - 3.85)			
TG (mg/dL)	E	139.33 (119.78 - 158.88)	125.07 (112.54 - 137.59)	0.1271	0.5459	0.3681
	S	153.84 (129.21 - 178.46)	158.22 (127.48 - 188.95)			
Glucosa (mg/dL)	E	103.3 (96.85 - 109.75)	100.08 (95.71 - 104.46)	0.5952	0.6413	0.0333
	S	98.46 (93.51 - 103.41)	101.02 (96.02 - 106.01)			
PAD (mmHg)	E	79.41 (77.42 - 81.41)	77.04 (74.95 - 79.13)	0.6659	0.0018	0.7833
	S	79.03 (76.5 - 81.56)	76.21 (73.79 - 78.63)			
PAS (mmHg)	E	122.36 (119.05 - 125.67)	122.31 (118.85 - 125.77)	0.9137	0.9903	0.9507
	S	122.04 (118.26 - 125.83)	122.13 (118.54 - 125.72)			

IMC, índice de masa corporal. TG, Triglicéridos. HDL, lipoproteína de alta densidad. LDL, lipoproteína de baja densidad. PAS, Presión arterial sistólica. PAD, Presión arterial diastólica. Tiempo 0: sin comenzar el tratamiento. Tiempo 12: después de los 12 meses de intervención. E, leche enriquecida. S, leche semidesnatada.

p-tiempo: indica la evolución en un mismo grupo desde el inicio al fin de la intervención.

p-leche: indica las diferencias entre grupos independientemente del tiempo.

*p-tiempo*leche*: indica las diferencias de evolución entre grupos como consecuencia del tratamiento recibido. El *p* valor de la interacción se ha ajustado por sexo y edad. Diferencia significativa $p < 0.05$

Se han encontrado diferencias significativas entre grupos (leche enriquecida y semidesnatada) en la evolución de los marcadores de perfil lipídico seleccionados. Los niveles de colesterol total ($p = 0.0008$) y el LDL colesterol ($p = 0.0037$) se han reducido de forma significativa en el grupo consumidor de leche enriquecida, e incrementado en el grupo consumidor de leche semidesnatada. Además, los cocientes CT/HDL y LDL/HDL también han disminuido de forma significativa en el grupo consumidor de leche enriquecida y aumentado en el grupo consumidor de leche semidesnatada ($p < 0.0001$ y $p = 0.0018$ respectivamente). En el caso del colesterol HDL ($p = 0.0334$), los niveles han aumentado de forma significativa en el grupo consumidor de leche enriquecida, frente al descenso ligero en el grupo consumidor de leche semidesnatada.

Por otro lado, también se han encontrado diferencias significativas con respecto a los niveles de glucosa en sangre ($p = 0.0333$). Los consumidores de leche enriquecida han presentado un descenso de los niveles, frente a los consumidores de leche semidesnatada que han mostrado una ligera subida.

No se han encontrado diferencias significativas en la evolución con respecto al IMC, la presión arterial y los niveles de triglicéridos entre grupos de tratamiento.

Las características genéticas estudiadas del total de los voluntarios (frecuencias por genotipos, alelos y equilibrio de *Hardy-Weinberg*), se describen en la tabla 4.17. Los resultados obtenidos se mantienen en consonancia con las frecuencias obtenidas en el Proyecto *HapMap* para la población CEU (Residentes de Utah con ancestros del norte y oeste de Europa).

Tabla 4.17 – Distribución de genotipos y frecuencias alélicas en 175 sujetos con riesgo cardiovascular moderado

Símbolo Gen	Localización	dbSNP ID	Genotipo			Equilibrio <i>Hardy-Weinberg</i>	
			Homocigoto común (%)	Heterocigoto (%)	Homocigoto variante (%)	Alelo minoritario Frecuencia (%)	<i>p</i> -valor*
APOB	2p24-p23	rs693	28.22	54.95	16.83	44.30	0.132
		rs1042031	60.78	32.84	6.37	22.80	0.428
IL4	5q31.1	rs2243250	67.98	28.08	3.94	18.00	0.628

NFKBIA	14q13	rs8904	30.29	45.19	24.52	47.10	0.215
PLA2G4B	15q11.2-q21.3	rs1197669	39.13	45.89	14.98	37.90	0.800
PPARA	22q13.31	rs6008259	70.67	25.48	3.85	16.60	0.354
		rs135551	50.00	42.00	8.00	29.00	0.880
		rs135549	35.10	48.56	16.35	40.60	0.969
SELE	1q22-q25	rs5368	82.52	16.02	1.46	9.50	0.568
SELP	1q22-q25	rs6131	67.15	27.54	5.31	19.10	0.171
		rs2205895	46.38	43.48	10.14	31.9	0.906
SREBF1	17p11.2	rs9902941	32.83	47.98	19.19	43.2	0.836
SREBF2	22q13	rs2229442	86.07	13.43	0.50	7.2	0.651
		rs2267443	33.17	48.08	18.75	42.8	0.875

SNP: polimorfismo de un solo nucleótido.
* Equilibrio de *Hardy-Weinberg*: χ^2 con un grado de libertad ($p > 0.05$).

En relación al análisis de resultados por genotipos, no se han encontrado diferencias significativas entre grupos a nivel basal en los siguientes marcadores: edad, IMC, colesterol total, HDL, LDL, cocientes TC/HDL y LDL/HDL, glucosa, triglicéridos y presión arterial.

Al evaluarse la modificación de los marcadores de riesgo cardiovascular tras la intervención, ha podido observarse una interacción significativa entre la evolución del cociente CT/HDL y los genotipos en varios de los polimorfismos analizados, como se muestran en la tabla 4.18.

Tabla 4.18 - Cambios en el cociente CT/HDL entre grupos y genotipos

			Modelo Dominante			Post-Hoc	
Grupo			Homocigoto común	Heterocigoto + Homocigoto variante	p-valor	Homocigoto común	Heterocigoto + Homocigoto variante
			Media (IC 95 %)	Media (IC 95 %)		(p- valor ajustado)	
APOB	rs693	E	-0.40 (-0.65 - -0.15)	-0.36 (-0.58 - -0.15)	1	1	0.0039
		S	-0.23 (-0.61 - 0.16)	0.32 (0.06 - 0.58)			
	rs1042031	E	-0.50 (-0.74 - -0.27)	-0.23 (-0.43 - -0.03)	0.9316	0.0061	1
		S	0.30 (0.02 - 0.57)	0.03 (-0.34 - 0.41)			
IL4	rs2243250	E	-0.41 (-0.61 - -0.21)	-0.26 (-0.54 - 0.02)	1	0.0014	1
		S	0.38 (0.06 - 0.71)	0.02 (-0.26 - 0.30)			
NFKBIA	rs8904	E	-0.34 (-0.61 - -0.08)	-0.39 (-0.59 - -0.19)	1	0.0697	0.0702
		S	0.47 (0.02 - 0.91)	0.15 (-0.10 - 0.41)			
PLA2G4B	rs1197669	E	-0.37 (-0.62 - -0.11)	-0.40 (-0.61 - -0.19)	1	1	0.0067
		S	0.09 (-0.30 - 0.48)	0.31 (0.04 - 0.58)			
PPARA	rs6008259	E	-0.37 (-0.58 - -0.16)	-0.39 (-0.63 - -0.15)	1	0.2751	0.0024
		S	0.15 (-0.14 - 0.43)	0.45 (0.15 - 0.75)			
	rs135551	E	-0.43 (-0.61 - -0.25)	-0.33 (-0.6 - -0.05)	0.0469	<0.0001	1

		S	0.62 (0.27 - 0.96)	-0.11 (-0.39 - 0.17)			
	rs135549	E	-0.50 (-0.71 - -0.29)	-0.31 (-0.53 - -0.10)	0.5019	0.0001	0.9729
		S	0.52 (0.19 - 0.86)	0.09 (-0.20 - 0.37)			
SELE	rs5368	E	-0.36 (-0.52 - -0.20)	-0.29 (-0.73 - 0.15)	1	0.0006	1
		S	0.3 (0.05 - 0.54)	-0.07 (-0.55 - 0.41)			
	rs6131	E	-0.3 (-0.47 - -0.13)	-0.53 (-0.87 - -0.19)	0.2549	0.3207	0.0450
SELP		S	0.07 (-0.17 - 0.3)	0.53 (0.09 - 0.97)			
	rs2205895	E	-0.62 (-0.88 - -0.36)	-0.16 (-0.34 - 0.03)	0.0008	<0.0001	1
		s	0.57 (0.23 - 0.92)	-0.07 (-0.33 - 0.18)			
SREBF1	rs9902941	E	-0.37 (-0.70 - -0.03)	-0.36 (-0.54 - -0.17)	0.9167	1	0.0002
		S	-0.16 (-0.52 - 0.20)	0.41 (0.14 - 0.68)			
	rs2229442	E	-0.42 (-0.62 - -0.23)	-0.20 (-0.53 - 0.13)	1	0.0022	1
SREBF2		S	0.23 (-0.01 - 0.47)	0.34 (-0.33 - 1.01)			
	rs2267443	E	-0.29 (-0.62 - 0.04)	-0.42 (-0.59 - -0.24)	1	1	0.0027
		S	0.15 (-0.19 - 0.49)	0.28 (-0.01 - 0.56)			
E, leche enriquecida. S, leche semidesnatada. Diferencia significativa $p < 0.05$							

De los polimorfismos analizados, las interacciones de rs135551 PPARA ($p = 0.0469$) así como SELP rs2205895 ($p = 0.0008$), han resultado significativas sobre los cambios del cociente CT/HDL, respecto al tipo de leche consumida.

Después del ajuste por comparaciones múltiples, estos polimorfismos también han mostrado una diferencia estadísticamente significativa sobre el cociente CT/HDL para los portadores del genotipo homocigoto común [PPARA rs135551 ($p_{CC} < 0.0001$) así como para el SELP rs2205895 ($p_{GG} < 0.0001$)].

En el caso del polimorfismo PPARA rs135551, como se puede ver en la figura 4.16, los consumidores de leche enriquecida portadores del genotipo homocigoto común (CC), han reducido de forma significativa el cociente CT/HDL (4.94 a 4.51. Diferencia: -0.43. IC 95 %: -0.61 a 0.25), frente a los consumidores de leche semidesnatada, que lo han aumentado (5.26 a 5.88. Diferencia: 0.62 IC 95%: 0.27 a 0.96).

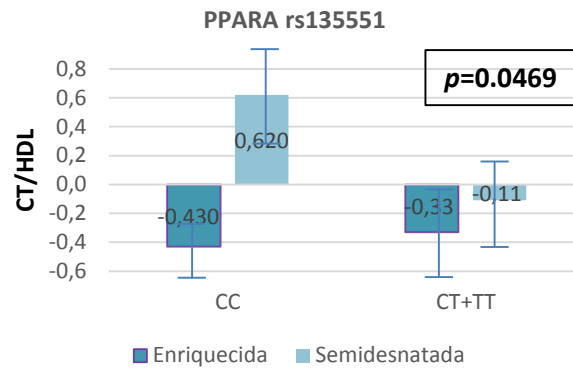


Figura 4.16 - Comparación del cambio en el cociente CT/HDL, en función del genotipo y el tipo de leche consumida.

Por otro lado, en los portadores del alelo T (CT+TT) del polimorfismo rs135551 PPARA, se produce una reducción del cociente CT/HDL en ambos tipos de consumidores, aunque este descenso (no significativo como se puede ver en la tabla 4.18) es más marcado en los consumidores de leche enriquecida.

No se ha observado una respuesta diferente en los restantes marcadores (CT ni LDL) en función de la presencia del polimorfismo rs135551 PPARA, excepto en los niveles de HDL en los que se ha apreciado una tendencia ($p = 0.0849$; $p_{CC} = 0.0542$).

Con respecto al análisis de desequilibrio de ligamiento, la variante rs135551 PPARA ha mostrado un nivel de heradabilidad ≤ 1.0 con la variante rs135549 del mismo gen, así como en el análisis de haplotipos, que se puede ver en la figura 4.17.

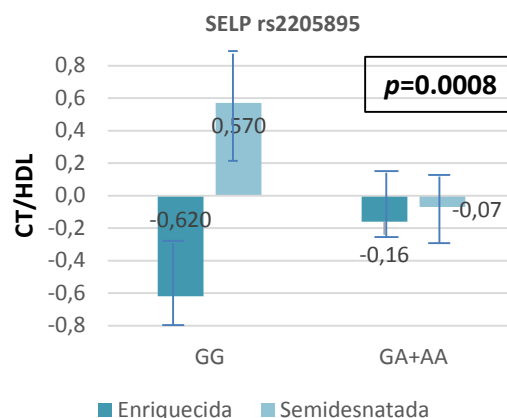


Figura 4.18 - Comparación del cambio en el cociente CT/HDL, en función del genotipo y el tipo de leche consumida.

Por otro lado, en los portadores del alelo A del polimorfismo rs2205895 SELP, se produce una bajada del cociente CT/HDL en ambos tipos de consumidores, aunque este descenso (no significativo como se puede ver en la tabla 4.18) es más marcado en los consumidores de leche enriquecida.

4.3.1.2 *Análisis de la diferente respuesta al consumo de grasa de leche y su efecto en la disminución de riesgo cardiovascular según los distintos perfiles genéticos.*

Este análisis se ha realizado en 161 sujetos del total de 297, correspondiente al grupo que consumió leche semidesnatada (n=85) y desnatada (n=76). Dichos participantes, con riesgo cardiovascular elevado, sometidos al estudio de intervención consumieron durante 12 meses 500 ml/día de leche semidesnatada o desnatada en función del grupo.

La tabla 4.19 resume los principales resultados obtenidos de los parámetros bioquímicos analizados tras las 12 semanas de consumo y los diferentes tipos de leche ingerida.

Grupo		Tiempo 0 Media (IC 95 %)	Tiempo 12 Media (IC 95 %)	p-tiempo	p- leche	p- tiempo*leche
IMC (kg/m ²)	S	28.08 (27.14 - 29.02)	28.47 (27.49 - 29.46)	0.0140	0.3828	0.5962
	D	28.75 (27.77 - 29.73)	29.00 (28.06 - 29.94)			
CT (mg/dl)	S	218.54 (211.17 - 225.91)	223.68 (216.30 - 231.07)	0.2690	0.2231	0.1782
	D	215.56 (208.24 - 222.88)	214.83 (207.67 - 221.98)			

HDL (mg/dl)	S	44.5 (41.92 - 47.08)	44.45 (41.55 - 47.34)	0.8772	0.7814	0.2229
	D	44.44 (41.88 - 46.99)	45.25 (42.63 - 47.87)			
LDL (mg/dl)	S	143.27 (135.46 - 151.08)	147.59 (138.7 - 156.49)	0.5608	0.6057	0.1390
	D	143.71 (135.64 - 151.79)	141.51 (134.05 - 148.97)			
CT/LDL	S	5.19 (4.90 - 5.48)	5.43 (5.06 - 5.79)	0.2435	0.4895	0.0806
	D	5.17 (4.82 - 5.52)	5.11 (4.71 - 5.51)			
LDL/HDL	S	3.41 (3.16 - 3.66)	3.55 (3.25 - 3.85)	0.7751	0.5804	0.0715
	D	3.43 (3.16 - 3.71)	3.32 (3.06 - 3.57)			
TG (mg/dl)	S	153.84 (129.21 - 178.46)	158.22 (127.48 - 188.95)	0.8734	0.2028	0.878
	D	137.04 (115.96 - 158.12)	141.20 (115.98 - 166.41)			
Glucosa (mg/dl)	S	98.46 (93.51 - 103.41)	101.02 (96.02 - 106.01)	0.0025	0.6505	0.5711
	D	101.43 (92.53 - 110.33)	104.96 (96.68 - 113.24)			
PAS (mmHg)	S	79.03 (76.50 - 81.56)	76.21 (73.79 - 78.63)	<0.0001	0.8177	0.7732
	D	78.93 (76.03 - 81.82)	75.58 (73.40 - 77.76)			
PAD (mmHg)	S	122.04 (118.26 - 125.83)	122.13 (118.54 - 125.72)	0.1535	0.2889	0.1382
	D	121.59 (117.78 - 125.41)	117.75 (114.42 - 121.09)			

IMC, índice de masa corporal. TG, Triglicéridos. HDL, lipoproteína de alta densidad. LDL, lipoproteína de baja densidad. PAS, Presión arterial sistólica. PAD, Presión arterial diastólica. Tiempo 0: sin comenzar el tratamiento. Tiempo 12: después de los 12 meses de intervención. S, leche semidesnatada. E, leche desnatada.

p-tiempo: indica la evolución en un mismo grupo desde el inicio al fin de la intervención.

p-leche: indica las diferencias entre grupos independientemente del tiempo.

*p-tiempo*leche*: indica las diferencias de evolución entre grupos como consecuencia del tratamiento recibido. El *p* valor de la interacción se ha ajustado por sexo y edad. Diferencia significativa *p* < 0.05

No se han encontrado diferencias significativas entre grupos (leche semidesnatada y desnatada) en la evolución de los marcadores de perfil lipídico seleccionados. Sin embargo, los biomarcadores de riesgo cardiovascular (colesterol total/HDL y LDL/HDL), han mostrado una tendencia a reducirse en el caso del grupo consumidor de leche desnatada y una tendencia a incrementarse en el grupo consumidor de leche semidesnatada.

Las características genéticas estudiadas del total de los voluntarios (frecuencias por genotipos y alelos, así como el equilibrio de *Hardy-Weinberg*), se describe en la tabla 4.20. Los resultados obtenidos se mantienen en consonancia con las frecuencias obtenidas en el Proyecto HapMap para la población CEU (Residentes de Utah con ancestros del norte y oeste de Europa).

Tabla 4.20 - Distribución de genotipos y frecuencias alélicas en 161 sujetos con moderado riesgo cardiovascular

Símbolo Gen	Localización	dbSNP ID	Genotipo			Equilibrio <i>Hardy-Weinberg</i>	
			Homocigoto común (%)	Heterocigoto (%)	Homocigoto variante (%)	Alelo minoritario Frecuencia (%)	<i>p</i> -valor*
APOB	2p24-p23	rs693	28.8	54	17.3	44.2	0.185
		rs1042031	61	33.1	5.8	22.4	0.667
IL4	5q31.1	rs2243250	69.1	27.7	3.2	17	0.631
NFKBIA	14q13	rs8904	30.4	47.3	22.3	45.9	0.352
PLA2G4B	15q11.2-q21.3	rs1197669	40.2	48	11.8	35.8	0.564
PPARA	22q13.31	rs6008259	71.1	25.5	3.4	16.1	0.371
		rs135551	48.6	42.8	8.6	30	0.751
		rs135549	47.3	34.2	18.5	35.6	0.575
SELE	1q22-q25	rs5368	83	16.1	0.9	9	0.899
SELP	1q22-q25	rs6131	65	28.7	6.2	20.6	0.178
		rs2205895	48	41.4	10.6	31.3	0.408
SREBF1	17p11.2	rs9902941	33.4	49.3	17.2	41.9	0.824
SREBF2	22q13	rs2229442	85.8	13.9	0.3	7.3	0.918
		rs2267443	32.8	45.4	21.8	44.5	0.968

SNP: polimorfismo de un solo nucleótido.
 * Equilibrio de *Hardy-Weinberg*: χ^2 con un grado de libertad ($p > 0.05$).

No se han encontrado diferencias significativas entre grupos a nivel basal en los siguientes marcadores: edad, IMC, colesterol total, HDL, LDL, cocientes TC/HDL y LDL/HDL, glucosa, triglicéridos o presión arterial.

Inicialmente han sido encontrados cinco polimorfismos genéticos asociados a cambios en los cocientes TC/HDL y LDL/HDL, respecto al tipo de leche consumida: rs135549 PPARA; rs135551 PPARA; rs5368 PPARA; rs2229442 SREBF2; rs6131 SELP, mostrados en las tablas 4.21 y 4.22.

Tabla 4.21 - Cambios en el cociente CT/HDL entre grupos y genotipos

Modelo Dominante						<i>Post-Hoc</i>	
Grupo		Homocigoto común	Heterocigoto + Homocigoto variante		<i>p</i> -valor	Homocigoto común	Heterocigoto + Homocigoto variante
		Media (IC 95 %)	Media (IC 95 %)			<i>(p-valor ajustado)</i>	
APOB	rs693	S	-0.23 (-0.61 - 0.16)	0.32 (0.06 - 0.58)	0.1317		
		D	-0.03 (-0.68 - 0.61)	-0.06 (-0.29 - 0.17)			
APOB	rs1042031	S	0.30 (0.02 - 0.57)	0.03 (-0.34 - 0.41)	0.7982		
		D	0.01 (-0.22 - 0.24)	-0.16 (-0.7 - 0.38)			
IL4	rs2243250	S	0.38 (0.06 - 0.71)	0.02 (-0.26 - 0.3)	0.2639		

		D	-0.07 (-0.35 - 0.21)	-0.01 (-0.56 - 0.54)			
NFKBIA	rs8904	S	0.47 (0.02 - 0.91)	0.15 (-0.1 - 0.41)	0.5556		
		D	0 (-0.60 - 0.60)	-0.09 (-0.33 - 0.14)			
PLA2G4B	rs1197669	S	0.09 (-0.30 - 0.48)	0.31 (0.04 - 0.58)	0.3033		
		D	0.04 (-0.45 - 0.54)	-0.11 (-0.38 - 0.17)			
	rs6008259	S	0.15 (-0.14 - 0.43)	0.45 (0.15 - 0.75)	0.7137		
		D	-0.11 (-0.34 - 0.12)	0.05 (-0.56 - 0.67)			
PPARα	rs135551	S	0.62 (0.27 - 0.96)	-0.11 (-0.39 - 0.17)	0.0273	0.161	1
		D	-0.07 (-0.39 - 0.26)	-0.03 (-0.41 - 0.35)			
	rs135549	S	0.52 (0.19 - 0.86)	0.09 (-0.2 - 0.37)	0.0248	0.043	1
		D	-0.29 (-0.63 - 0.05)	0.07 (-0.27 - 0.4)			
SELE	rs5368	S	0.30 (0.05 - 0.54)	-0.07 (-0.55 - 0.41)	0.0222	0.2428	1
		D	-0.13 (-0.33 - 0.06)	0.54 (-0.55 - 1.63)			
	rs6131	S	0.07 (-0.17 - 0.3)	0.53 (0.09 - 0.97)	0.1647		
		D	-0.05 (-0.29 - 0.18)	-0.07 (-0.56 - 0.42)			
SELP	rs2205895	S	0.57 (0.23 - 0.92)	-0.07 (-0.33 - 0.18)	0.0728		
		D	-0.04 (-0.43 - 0.35)	-0.08 (-0.4 - 0.23)			
SREBF1	rs9902941	S	-0.16 (-0.52 - 0.20)	0.41 (0.14 - 0.68)	0.9828		
		D	-0.42 (-0.73 - -0.11)	0.14 (-0.2 - 0.48)			
	rs2229442	S	0.23 (-0.01 - 0.47)	0.34 (-0.33 - 1.01)	0.0569	1	0.4598
		D	0.09 (-0.19 - 0.37)	-0.8 (-1.27 - -0.34)			
SREBF2	rs2267443	S	0.15 (-0.19 - 0.49)	0.28 (-0.01 - 0.56)	0.5444		
		D	0 (-0.57 - 0.56)	-0.09 (-0.33 - 0.15)			
S, leche semidesnatada. D, leche desnatada. Diferencia significativa p<0.05.							

Tabla 4.22 - Cambios en el cociente LDL/HDL entre grupos y genotipos

			Modelo Dominante		Post-Hoc	
	Grupo		Homocigoto común	Heterocigoto + Homocigoto variante	p-valor	Homocigoto común o Heterocigoto + Homocigoto variante
			Media (IC 95 %)	Media (IC 95 %)		(p- valor ajustado)
APOB	rs693	S	-0.15 (-0.55 - 0.25)	0.19 (-0.06 - 0.43)	0.3032	
		D	-0.11 (-0.50 - 0.27)	-0.11 (-0.30 - 0.08)		
	rs1042031	S	0.25 (0.00 - 0.50)	-0.21 (-0.55 - 0.12)	0.2243	
		D	-0.08 (-0.26 - 0.11)	-0.19 (-0.53 - 0.16)		
IL4	rs2243250	S	0.22 (-0.09 - 0.54)	0.00 (-0.25 - 0.25)	0.4076	
		D	-0.12 (-0.30 - 0.05)	-0.09 (-0.55 - 0.38)		
NFKBIA	rs8904	S	0.19 (-0.29 - 0.67)	0.12 (-0.11 - 0.35)	0.6822	
		D	-0.16 (-0.49 - 0.18)	-0.1 (-0.30 - 0.10)		
PLA2G4B	rs1197669	S	0.11 (-0.25 - 0.47)	0.15 (-0.11 - 0.41)	0.7491	
		D	-0.07 (-0.32 - 0.17)	-0.13 (-0.37 - 0.11)		
PPARα	rs6008259	S	0.01 (-0.25 - 0.28)	0.44 (0.13 - 0.74)	0.1438	

		D	-0.11 (-0.32 - 0.10)	-0.13 (-0.43 - 0.18)			
	rs135551	S	0.39 (0.04 - 0.73)	-0.1 (-0.36 - 0.16)	0.1129		
		D	-0.09 (-0.37 - 0.19)	-0.12 (-0.33 - 0.09)			
	rs135549	S	0.47 (0.16 - 0.79)	-0.04 (-0.30 - 0.23)	0.0060	0.0156	1
		D	-0.31 (-0.58 - -0.03)	-0.01 (-0.23 - 0.20)			
SELE	rs5368	S	0.19 (-0.04 - 0.43)	-0.15 (-0.59 - 0.29)	0.0864	0.8451	1
		D	-0.13 (-0.3 - 0.04)	0.17 (-0.25 - 0.60)			
SELP	rs6131	S	-0.02 (-0.24 - 0.21)	0.41 (0.00 - 0.82)	0.0442	1	0.6170
		D	-0.05 (-0.24 - 0.14)	-0.2 (-0.50 - 0.1)			
	rs2205895	S	0.34 (0.01 - 0.66)	-0.05 (-0.30 - 0.21)	0.1572		
		D	-0.12 (-0.34 - 0.09)	-0.11 (-0.38 - 0.16)			
SREBF1	rs9902941	S	-0.03 (-0.41 - 0.36)	0.21 (-0.05 - 0.46)	0.9193		
		D	-0.29 (-0.59 - 0.02)	-0.02 (-0.23 - 0.19)			
SREBF2	rs2229442	S	0.12 (-0.1 - 0.35)	0.33 (-0.27 - 0.93)	0.0266	1	0.3927
		D	0.02 (-0.16 - 0.19)	-0.75 (-1.21 - 0.28)			
	rs2267443	S	0.10 (-0.23 - 0.42)	0.16 (-0.11 - 0.42)	0.9210		
		D	-0.18 (-0.46 - 0.10)	-0.08 (-0.3 - 0.13)			
S, leche semidesnatada. D, leche desnatada. Diferencia significativa $p < 0.05$.							

Después del ajuste por comparaciones múltiples, se ha encontrado una interacción estadísticamente significativa para el rs135549 PPARA. El genotipo TT de este polimorfismo presenta una asociación significativa en ambos cocientes CT/HDL y LDL/HDL, después de doce meses de consumir leche desnatada.

De esta manera, como se puede ver en las figuras 4.19 y 4.20, los portadores del genotipo TT para este polimorfismo (rs135549 PPARA) han presentado una reducción significativa [CT/HDL: -0.29 (IC95 %: -0.63 a 0.05) y LDL/HDL: -0.31 (IC95 %: -0.58 - -0.030) para ambos cocientes] después de consumir leche desnatada, frente a los consumidores de leche semidesnatada que presentaron un aumento significativo [CT/HDL: 0.52 (IC95 %: 0.19 - 0.86) y LDL/HDL: 0.47 (IC95 %: 0.16 a 0.79)].

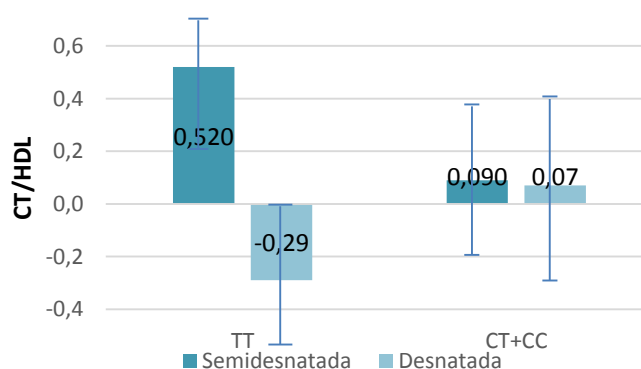


Figura 4.19 - Comparación del cambio en el cociente CT/HDL, en función del genotipo y el tipo de leche consumida.

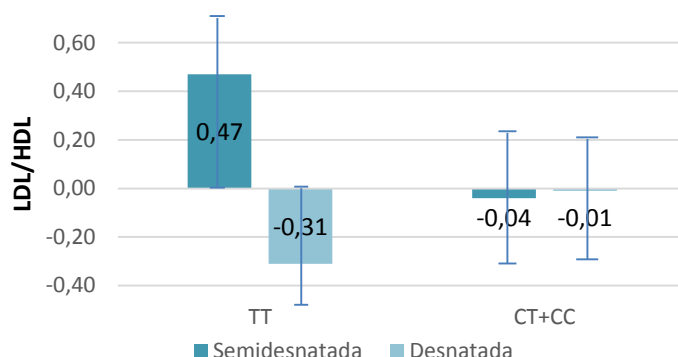


Figura 4.20 - Comparación del cambio en el cociente LDL/HDL, en función del genotipo y el tipo de leche consumida.

También se ha observado, con una reducción de los niveles de LDL colesterol y colesterol total después del consumo de leche desnatada (LDL: -6.99; IC 95 %: -14.75 - 0.76 y CT: -6.06; IC 95 %: -14.74 - 2.63 mg/dl), frente a un incremento en los consumidores de leche semidesnatada (LDL: 12.25; IC 95 %: 0.52 - 23.97 y CT: 8.92, IC 95 %: -1.66 - 19.50 mg/dl), aunque las diferencias no han alcanzado la significación.

En el caso de los resultados obtenidos para los portadores del alelo C, no se han encontrado diferencias en los cocientes CT/HDL y LDL/HDL con respecto al consumo de diferente tipo de leche. Tampoco se han encontrado diferencias por genotipo y tipo de leches para el IMC, colesterol total, HDL, glucosa, triglicéridos o presión arterial.

4.3.2 “ESTUDIO DE INTERVENCIÓN NUTRICIONAL SOBRE LA EFICACIA DE LA INGESTA DIARIA DE UNA BEBIDA LÁCTEA EN VOLUNTARIOS SANOS CON SOBREPESO Y OBESIDAD”

4.3.2.1 Características generales de la muestra estudiada

La muestra estudiada ha incluido un total de 85 participantes, 44 pertenecientes al grupo de estudio (18 hombres y 44 mujeres), y 41 pertenecientes al grupo control (15 hombres y 26 mujeres), con edades comprendidas entre los 19 y 66 años.

La tabla 4.23 resume las características basales principales, no encontrándose diferencias significativas entre los grupos estudiados en ninguna de las variables analizadas.

Tabla 4.23 - Características basales de la muestra en función del grupo de aleatorización (X ± DT)			
	Grupo de estudio (n=54)	Grupo control (n=53)	p
Edad (años)	40.55 ± 10.67	41.30 ± 10.54	0.217
Bioquímica			
Glucemia (mg/dl)	78.65 ± 9.36	80.98 ± 19.97	0.980
CT (mg/dl)	214.13 ± 38.48	209.95 ± 32.09	0.543
HDL (mg/dl)	45.86 ± 10.71	48.10 ± 14.43	0.656
LDL (mg/dl)	136.88 ± 32.99	130.60 ± 31.75.12	0.318
LDL/HDL	3.13 ± 1.01	2.94 ± 1.05	0.331
CT/HDL	4.86 ± 1.21	4.64 ± 1.25	0.366
TG (mg/dl)	118.72 ± 55.52	117.25 ± 50.55	0.84
Apo A (mg/dl)	148.69 ± 27.51	149.02 ± 27.61	0.844
Apo B1 (mg/dl)	121.18 ± 29.6	113.89 ± 27.65	0.148
ApoB1/A	0.84 ± 0.24	0.79 ± 0.24	0.297
Dieta			
Energía (Kcal/día)	2071 ± 520	1950 ± 549	0.444
Hidratos de Carbono (% kcal)	37.12 ± 6.54	38.33 ± 6.32	0.635
Proteínas (% kcal)	16.65 ± 2.83	17.40 ± 2.77	0.360
Grasa (% kcal)	42.06 ± 6.41	39.78 ± 5.72	0.206
Antropometría			
Peso (kg)	85.32 ± 13.27	85.59 ± 15.43	0.921
IMC (kg/m ²)	30.39±2.82	30.93±3.76	0.403
Circunferencia cintura (cm)	101.43±10.17	100.67±13.19	0.74
Circunferencia cadera (cm)	112.25±6.55	113.71±7.97	0.329
Grasa (%)	39.09±7.11	39.93±6.29	0.524
Grasa (kg)	33.09±6.52	34.1±7.96	0.540
Músculo (%)	27.26±4.33	26.68±3.57	0.600

Los resultados obtenidos indican que la randomización de la muestra ha permitido obtener dos grupos de intervención homogéneos. El estudio se ha llevado a cabo durante 12 semanas en las que han tenido lugar tres visitas de fase experimental. En ellas se tomaron datos antropométricos, historia clínica, constantes vitales, datos relativos a la dieta y a hábitos de estilo de vida, cumplimiento del consumo del producto, efectos adversos entre otros, así como determinaciones bioquímicas en la primera y última visita.

4.3.2.2 Valoración de la eficacia tras la intervención

Modificación de la composición corporal

Ambos grupos de tratamiento (estudio y control) han presentado una reducción significativa de peso, IMC, MG (kg y %), circunferencia de la cintura (Cci), circunferencia de la cadera (Cad) tras la intervención ($p < 0.001$) y un incremento significativo de los niveles de masa muscular ($p < 0.001$). Sin embargo, no se han observado diferencias en el comportamiento entre grupos (interacción tiempo x tratamiento $p > 0.05$), como se puede ver en la tabla 4.24.

A su vez, la evolución de los parámetros antropométricos se ha determinado en cada una de las visitas realizadas (v1 a v4) no observándose diferencias significativas entre los grupos en ninguna de ellas ($p > 0.05$).

Tabla 4.24 – Evolución de los parámetros antropométricos de la intervención

	Estudio		Control		p^*		
	Inicio Media (IC 95 %)	Fin Media (IC 95 %)	Inicio Media (IC 95 %)	Fin Media (IC 95 %)	visita	grupo	visita x grupo
Peso (kg)	85.0 (81.2-88.8)	82.1 (78.2-86)	86.3 (81.3-91.2)	83.1 (78-88.2)	<0,001	0.706	0.616
IMC (kg/m²)	30.5 (29.8-31.3)	29.4 (28.7-30.2)	30.9 (29.7-32)	29.7 (28.5-30.9)	<0,001	0.659	0.677
MG(kg)	33.1 (31.4-34.8)	30.4 (28.8-32.1)	33.8 (31.3-36.3)	31.2 (28.8-33.7)	<0,001	0.612	0.84
MG (%)	39.4 (37.4-41.5)	37.6 (35.5-39.7)	39.4 (37.5-41.3)	37.7 (35.7-39.7)	<0,001	0.982	0.646
MM (%)	27.1 (25.8-28.4)	27.9 (26.6-29.2)	27.0 (25.9-28.1)	27.7 (26.5-28.9)	<0,001	0.870	0.594
Cci (cm)	101.8 (98.8-104.7)	98.0 (95.2-100.8)	101.0 (96.9-105.2)	97.2 (93.2-101.1)	<0,001	0.739	0.894
Cad (cm)	112.6 (110.8-114.5)	109.9 (107.9-111.9)	113.7 (111.1-116.4)	111.1 (108.6-113.6)	<0,001	0.457	0.969

MG (Kg. y %), porcentaje de masa grasa; MM (%), masa muscular (medidas por bioimpedancia); Cci., circunferencia de la cintura; Cad., circunferencia de la cadera.

**Efecto visita*: indica la evolución en un mismo grupo desde el inicio al fin de la intervención.

Efecto grupo: indica las diferencias entre grupos independientemente del tiempo.

Efecto visita x grupo: indica las diferencias de evolución entre grupos como consecuencia del tratamiento recibido. p valor significativo < 0.05 .

Como se puede observar en la figura 4.21, la reducción media de masa grasa en kg del grupo de estudio ha resultado ligeramente mayor a la del grupo control [- 2.69 (DT: 2.25) vs - 2.58. (DT: 2.79) kg grasa total, $p > 0.05$] a pesar de que la pérdida de peso ha sido mayor en este último. No obstante, las diferencias no han alcanzado la significación estadística.

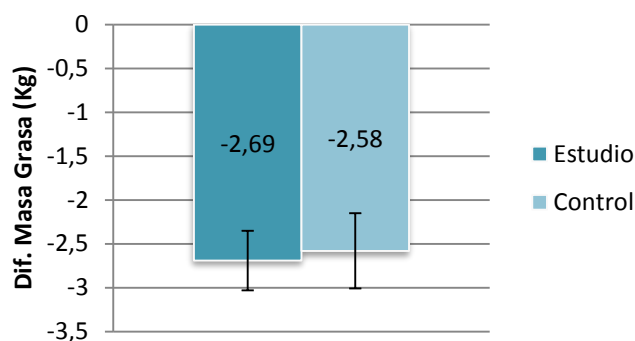


Figura 4.21 – Modificación de los niveles de masa grasa (kg) medida por bioimpedancia tras la intervención entre grupos/tratamiento (media, SEM).

La evolución de los niveles de masa grasa se determinó en cada una de las visitas realizadas (v1 a v4) no observándose diferencias significativas entre los grupos en ninguna de ellas (interacción tiempo x tratamiento: $p > 0.05$).

Efecto del producto sobre el metabolismo de la glucosa

Tras la intervención, se ha observado una reducción significativa ($p < 0.05$) de la glucemia basal, insulina basal e índice HOMA, no observándose diferencias en la evolución de acuerdo al tratamiento (estudio o control). Los niveles de HbA1c presentaron un aumento de forma significativa en ambos grupos sin diferencias entre ellos.

No obstante, como se puede ver en la tabla 4.25 y la figura 4.22, la reducción media de la glucemia basal [-3.09 (DT: 7.28) vs -1.05 (DT: 7.12) mg/dl], insulina basal [-1.59 (DT: 3.25) vs -1.08 (DT: 3.51) mUI/ml] e índice HOMA [-0.4 (DT: 0.78) vs -0.23 (DT: 0.77)] del grupo de estudio fue mayor a la del grupo control, aunque estas diferencias no alcanzaron la significación estadística $p > 0.05$).

Tabla 4.25 – Evolución del metabolismo de la glucosa en la intervención

	Estudio		Control		Efecto (p)*		
	Inicio Media (IC 95 %)	Fin Media (IC 95 %)	Inicio Media (IC 95 %)	Fin Media (IC 95 %)	visita	grupo	visita x grupo
Glucemia (mg/dl)	79.2 (76.4-82)	76.1 (73.5-78.7)	78.1 (75.2-81)	77.1 (74.3-79.8)	0.009	0.964	0.198
Insulinemia (mUI/ml)	10.2 (8.3-12.1)	8.6 (7.3-10)	10.1 (8.7-11.6)	9.1 (7.8-10.3)	<0.001	0.855	0.494
HOMA	2.1 (1.6-2.5)	1.6 (1.4-1.9)	1.9 (1.7-2.3)	1.7 (1.5-2)	<0.001	0.911	0.313
HbA1c (%)	5.3 (5.2-5.4)	5.4 (5.3-5.5)	5.2 (5.1-5.4)	5.4 (5.3-5.5)	<0.009	0.443	0.638

HOMA, índice de resistencia insulínica. HbA1c, hemoglobina glicosilada.

**Efecto visita*, indica la evolución en un mismo grupo desde el inicio al fin de la intervención.

Efecto grupo, indica las diferencias entre grupos independientemente del tiempo.

Efecto visita x grupo, indica las diferencias de evolución entre grupos como consecuencia del tratamiento recibido. p valor significativo < 0.05 .

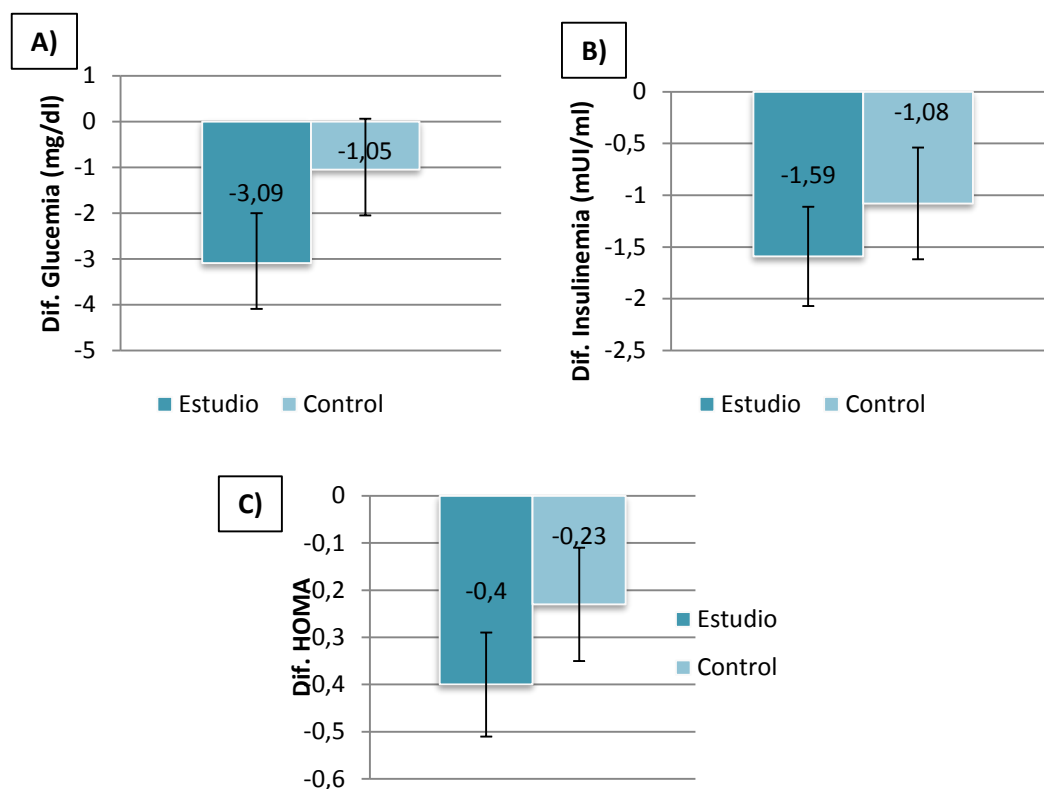


Figura 4.22 – A) Modificación de la glucemia basal; B) insulinemia basal; C) Índice HOMA tras la intervención por grupo/tratamiento (media, SEM).

Presión arterial y frecuencia cardiaca

Como se puede observar en la tabla 4.26, los dos grupos de tratamiento (estudio y control) han presentado una reducción significativa de la presión arterial sistólica, diastólica y frecuencia cardiaca al final de la intervención ($p < 0.001$). Sin embargo, no se han observado diferencias significativas en el comportamiento entre grupos.

Tabla 4.26 – Evolución de la presión arterial y la frecuencia cardíaca en la intervención

	Estudio		Control		Efecto (p)*		
	Inicio Media (IC 95 %)	Fin Media (IC 95 %)	Inicio Media (IC 95 %)	Fin Media (IC 95 %)	visita	grupo	visita x grupo
PAS (mmHg)	127.7 (124.2-130.9)	124.5 (120.7-128.4)	129.6 (125.3-134)	123.7 (119.4-128)	<0,001	0,802	0,199
PAD (mmHg)	78.5 (76.1-81)	76.2 (73.6-78.9)	80.2 (77.6-82.9)	75.4 (73.1-77.8)	<0,001	0,794	0,06
FC (lat./min)	71.8 (68.9-74.8)	69.7 (66.7-72.7)	72.7 (69.1-76.3)	69.8 (66.9-72.7)	0.026	0,81	0,719

PAS, presión Arterial Sistólica; PAD, Presión Arterial Diastólica; FC, frecuencia cardíaca
**Efecto visita:* indica la evolución en un mismo grupo desde el inicio al fin de la intervención.
Efecto grupo: indica las diferencias entre grupos independientemente del tiempo.
Efecto visita x grupo: indica las diferencias de evolución entre grupos como consecuencia del tratamiento recibido. *p* valor significativo < 0.05.

Evolución del perfil lipídico

Como se puede observar en la tabla 4.27, los dos grupos de tratamiento (estudio y control) han presentado una reducción significativa de colesterol total en sangre, triglicéridos y niveles de ApoB1 tras la intervención ($p < 0.001$). También se puede observar una reducción significativa del cociente CT/HDL. La reducción del cociente LDL/HD ha presentado valores cercanos a la significación.

No se han observado diferencias significativas en el comportamiento entre grupos, no obstante, como se puede apreciar en la figura 4.23 la reducción media de los niveles de colesterol total ha resultado mayor en el grupo de estudio frente al control [-12.27 (DT: 25.03) vs -6.87 (DT: 19.70) mg/dl respectivamente). Del mismo modo, mientras que el grupo de estudio ha reducido sus niveles de colesterol LDL, el grupo control los ha incrementado [-2.28 (DT: 24.32) vs 4.68 (DT: 17.39) mg/dl, respectivamente). Como se puede ver en la tabla 4.27 la reducción media de los cocientes (CT/HDL, LDL/HDL y ApoB/ApoA1) también ha resultado mayor en el grupo de estudio.

Tabla 4.27 - Evolución de los parámetros bioquímicos en la intervención

	Estudio		Control		Efecto (p)*		
	Inicio Media (IC 95 %)	Fin Media (IC 95 %)	Inicio Media (IC 95 %)	Fin Media (IC 95 %)	visita	grupo	visita x grupo
CT (mg/dl)	215.1 (202.9-227.3)	202.8 (192.4-213.3)	208.5 (198.7-218.4)	201.7 (192.8-210.5)	<0.0010	0.5680	0.2750
HDL (mg/dl)	45.8 (42.4-49.3)	46.7 (43.6-49.9)	48.2 (43.4-53.0)	49.1 (45.5-52.9)	0.2700	0.3470	0.9900
TG (mg/dl)	116.4 (98.1-134.8)	108.2 (95.2-121.4)	108.8 (97.6-120.1.0)	96.1 (84.7-107.5)	0.0030	0.3010	0.5070
LDL (mg/dl)	138.0 (127.8-148.2)	135.7 (126.1-145.4)	130.3 (120.7-140.0)	135.0 (125.8-144.2)	0.6420	0.5140	0.1320
ApoA (mg/dl)	148.8	145.5	149.1	146.4	0,2060	0.9130	0.9040

	(140-157.6)	(138-153.1)	(139.9-158.4)	(138.3-154.6)			
ApoB1 (mg/dl)	121.3 (112-130.6)	109.6 (102.1-117.1)	112.4 (104.2-120.7)	105.1 (97.9-112.3)	<0.0010	0.2300	0.1710
Coc.LDL/HDL	3.17 (2.9-3.5)	3.00 (2.8-3.2)	2.93 (2.6-3.2)	2.93 (2.6-3.2)	0.0790	0.4550	0.1430
Coc.CT/HDL	4.91 (4.5-5.3)	4.47 (4.2-4.8)	4.61 (4.3-5)	4.30 (4-4.6)	<0.0010	0.3330	0,3580
Coc.ApoB/ApoA1	0.84 (0.8-0.9)	0.76 (0.7-0.8)	0.78 (0.7-0.9)	0.75 (0.7-0.8)	<0.0010	0.4400	0.1450

CT=Coolesterol total, TG=triglicéridos
**Efecto visita:* indica la evolución en un mismo grupo desde el inicio al fin de la intervención.
Efecto grupo: indica las diferencias entre grupos independientemente del tiempo.
Efecto visita x grupo: indica las diferencias de evolución entre grupos como consecuencia del tratamiento recibido. *p* valor significativo < 0.05.

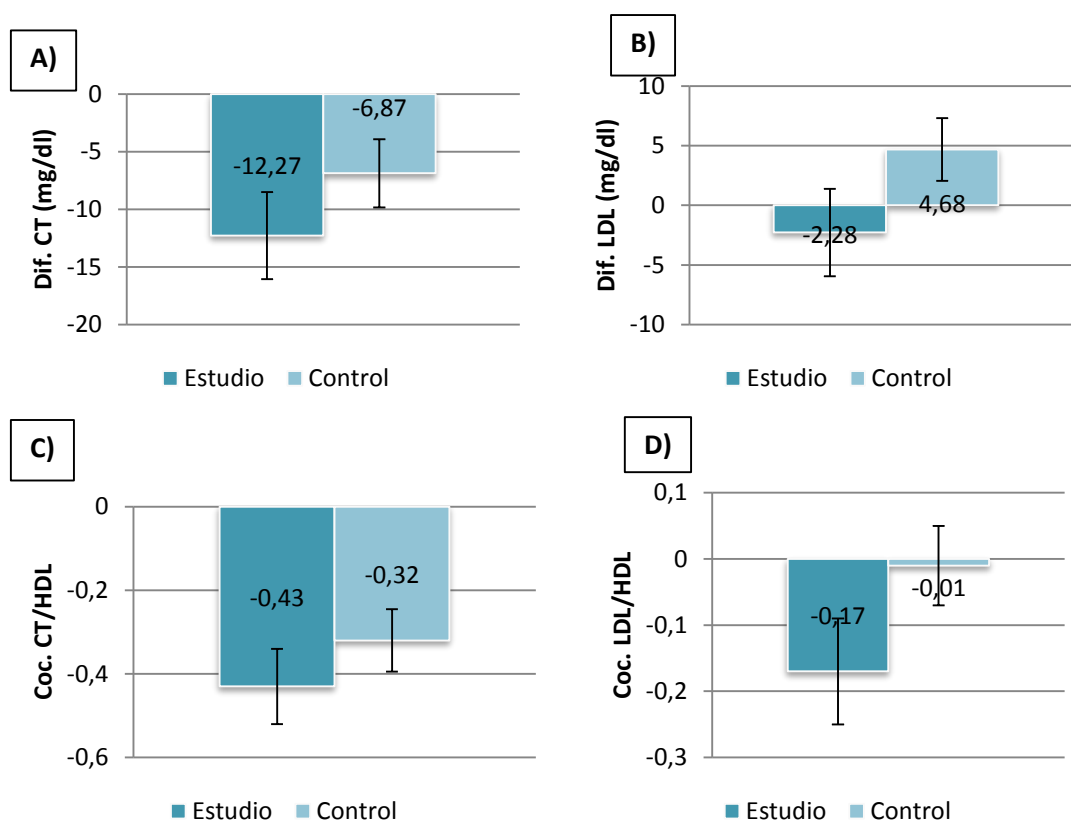


Figura 4.23 - Modificación de los niveles de colesterol total A), colesterol LDL B), y C)-D) cocientes (CT/HDL y LDL/HDL) tras la intervención por grupo/tratamiento (media, SEM).

Evolución de la saciedad

La valoración de la Escala Analógica Visual (VAS) permitió comparar la evaluación de las sensaciones de apetito y saciedad de los voluntarios en los distintos tiempos a lo largo de un desayuno estandarizado. Si bien en el análisis de medidas repetidas no se ha observado una interacción tiempo * tratamiento significativo ($p > 0.05$), sí que ha podido observarse como el

grupo que consumió la bebida estudio mantuvo niveles más altos en las escalas de saciedad y plenitud y más bajos en las escalas de hambre y deseo de ingerir alimentos en relación a la bebida control. Para la escala de hambre, pudo observarse que el grupo control aumentó de forma significativa la escala de hambre en el período comprendido entre después del desayuno y los 120 minutos ($p = 0.0322$), en cambio los consumidores del grupo estudio, este incremento no fue significativo.

En la figura 4.24, se representa la evolución de la sensación de hambre, saciedad y deseo de comer tras el desayuno estándar.

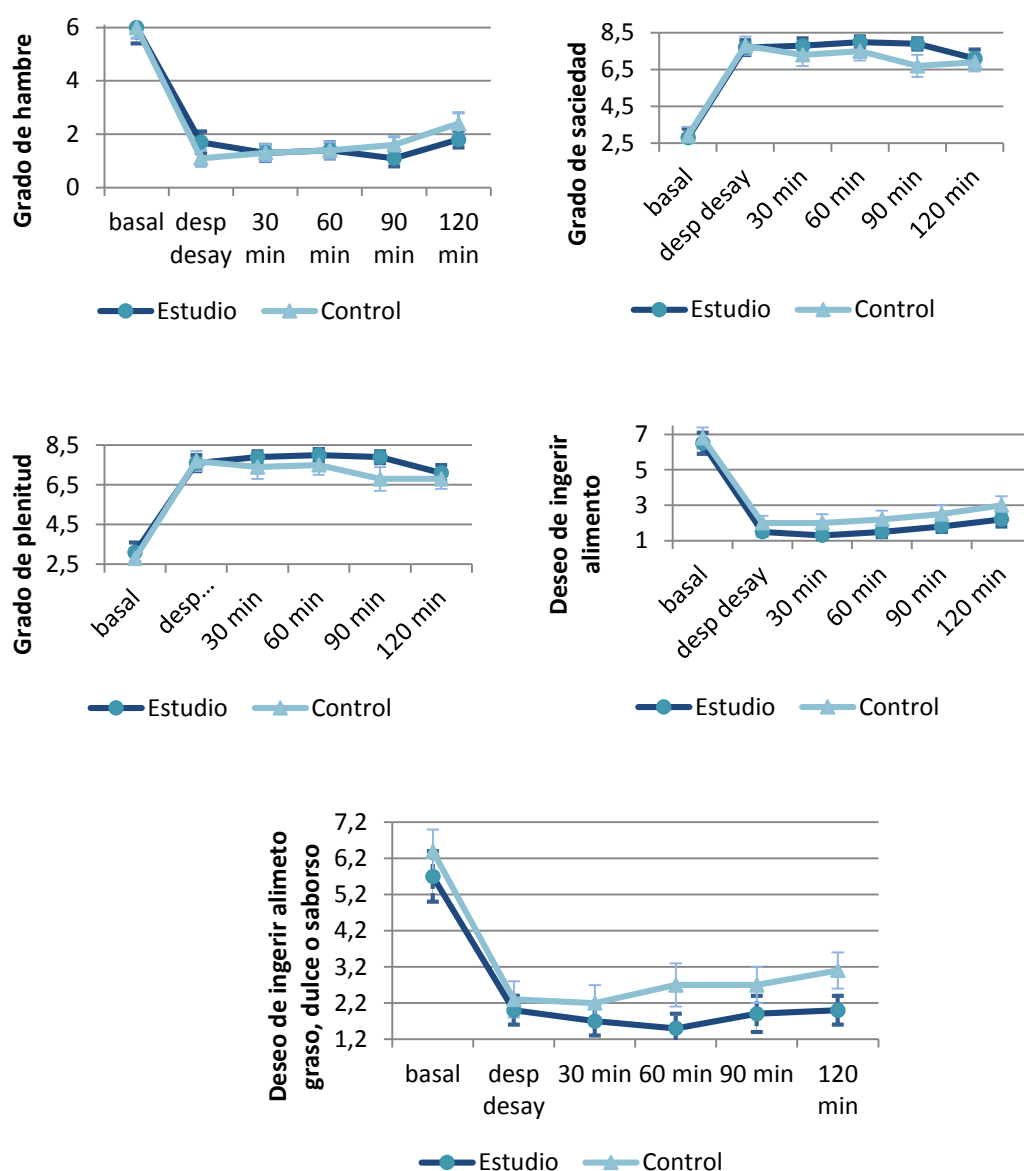


Figura 4.24 - Evolución de la sensación de hambre, saciedad y deseo de comer.

4.3.2.3 Evaluación de la seguridad y tolerancia

Parámetros de seguridad evaluados

Los parámetros de seguridad evaluados se han mantenido dentro de los rangos de normalidad durante todo el tratamiento. En la tabla 4.28 se muestra la evolución de los parámetros de seguridad analizados.

Tabla 4.28 - Evolución de los parámetros de seguridad evaluados

	Estudio		Control		Efecto (p)*		
	Inicio Media (IC 95 %)	Fin Media (IC 95 %)	Inicio Media (IC 95 %)	Fin Media (IC 95 %)	visita	grupo	Visita x grupo
Urato (mg/dl)	5.6 (5.2-6.1)	5.5 (5.1-5.9)	5.5 (5-5.9)	5.3 (4.9-5.8)	0.0560	0.5880	0.6960
GOT-AST (UI/l)	20.6 (18.3-22.9)	18.6 (17-20.2)	21.4 (18.9-23.9)	17.4 (15.3-19.5)	<0.0010	0.880	0.0950
GPT- ALT (UI/l)	26.9 (20.6-33.2)	23.9 (19.6-28.2)	28.5 (22.8-34.1)	20.4 (17.7-23.2)	<0.0010	0.7820	0.0890
Creatinina (mg/dl)	0.82 (0.8-0.9)	0.86 (0.8-0.9)	0.83 (0.8-0.9)	0.84 (0.8-0.9)	0.0050	0.9750	0.1220
GOT-AST, transaminasa Glutámico-oxalacética. GPT-ALT, transaminasa Glutamicopirúvica. * Efecto visita: indica la evolución en un mismo grupo desde el inicio al fin de la intervención. Efecto grupo: indica las diferencias entre grupos independientemente del tiempo. Efecto visita x grupo: indica las diferencias de evolución entre grupos como consecuencia del tratamiento recibido. <i>p</i> valor significativo < 0.05.							

Con respecto a los niveles de enzimas hepáticas estos se redujeron significativamente entre visitas. No se han observado cambios en los niveles de urea. Los niveles de creatinina han mostrado un ligero incremento, aunque manteniéndose en todos los casos en rangos de normalidad. No se observaron diferencias entre grupos para ninguno de los parámetros de seguridad evaluados.

Sintomatología y tolerancia

Los síntomas contemplados en la evaluación de la tolerancia al producto durante el periodo de intervención, se muestran en la tabla 4.29. Como puede observarse los síntomas más frecuentes han sido el estreñimiento y la distensión abdominal, aunque, no se han observado diferencias significativas entre los que consumieron la bebida estudio y la bebida control.

Tabla 4.29 - Porcentaje de participantes que presentó alguno de los síntomas valorados por visitas y grupo.									
Síntoma	Visita								
	v1-v2			v2-v3			v3-v4		
%	Estudio	Control	<i>p</i>	Estudio	Control	<i>p</i>	Estudio	Control	<i>p</i>
Nauseas	0	0	-	0	2.4	0.482	0	0	-
Acidez	0	2.4	0.482	0	4.8	0.229	0	2.4	0.482
Diarrea	4.5	2.4	1	2.2	0	1	2.2	2.4	1
Estreñimiento	20.4	12.2	0.386	11.3	12.2	1	9.0	7.3	1
Distensión abdominal	20.4	24.4	0.795	15.9	14.6	1	18.2	10.2	0.552
Halitosis	2.2	9.7	0.191	0	7.3	0.107	2.2	2.4	1
Repite el sabor	2.2	0	1	0	0	-	0	0	-
Efecto diurético	0	0	-	9.0	2.4	0.361	0	0	-
Reduce el estreñimiento	4.5	0	0.494	0	0	-	0	0	-
Presencia de síntoma adverso grave	0	0	-	0	0	-	0	0	-

4.3.2.4 Variables de control de cumplimiento

Del consumo del batido

La adherencia media del consumo del producto en base al cuestionario de consumo realizado por los participantes ha resultado superior al 90 %. Del total de voluntarios participantes, para el análisis de eficacia se han excluido tres sujetos debido a que no llegaron a cumplir el consumo mínimo fijado en un 75 % como media de las tres visitas, con el objetivo de no influir en los resultados observados.

A lo largo de la última visita se ha podido observar un descenso significativo en el porcentaje medio de consumo del grupo control (p visita por grupo= 0.041, IC95 %: 90.2-96.3), no observándose dicha variación en el grupo de estudio el cual ha mantenido el consumo a lo largo de toda la intervención (superior al 95 %).

De la dieta

El objetivo fundamental del control de esta variable ha sido evitar que las diferencias que podían observarse en los resultados entre grupos se debiesen a un cumplimiento diferente de

la pauta dietética entre ambos (más adherentes o menos adherentes) y no estuviesen relacionados con el producto de estudio. Para ello se han estudiado los aspectos comentados a continuación en relación a la dieta.

El valor calórico de la dieta indicada se ha calculado de forma individualizada de acuerdo a los requerimientos y ha oscilado entre las 1300 - 2400 kcal. Se ha mostrado un consumo medio de 1779.5 (DT: 301.8) kcal en el grupo estudio y de 1750 (DT: 254.9) kcal en el grupo control, no existiendo diferencias significativas entre grupos $p = 0.742$.

Como resultado de la dieta indicada ambos grupos (estudio y control) han reducido significativamente su ingesta calórica en relación a la habitual testeada mediante registro de consumo de alimentos y bebidas de 72 horas entre la visita inicial y la segunda visita, pasando de 1990 (DT: 497) a 1694 (DT: 393) kcal en el grupo estudio, y de 1930 (DT: 510) a 1591 (DT: 306) kcal en el grupo control ($p < 0.05$). No se han observado diferencias en la evolución entre grupos ($p = 0.174$).

Como se muestra en la figura 4.25, en el análisis de medidas repetidas realizado se observa el cambio entre visitas (marcado por las diferencias entre la V1 y V2) así como la falta de diferencia entre grupos y entre el comportamiento entre ambos en el tiempo ($p = 0.508$).

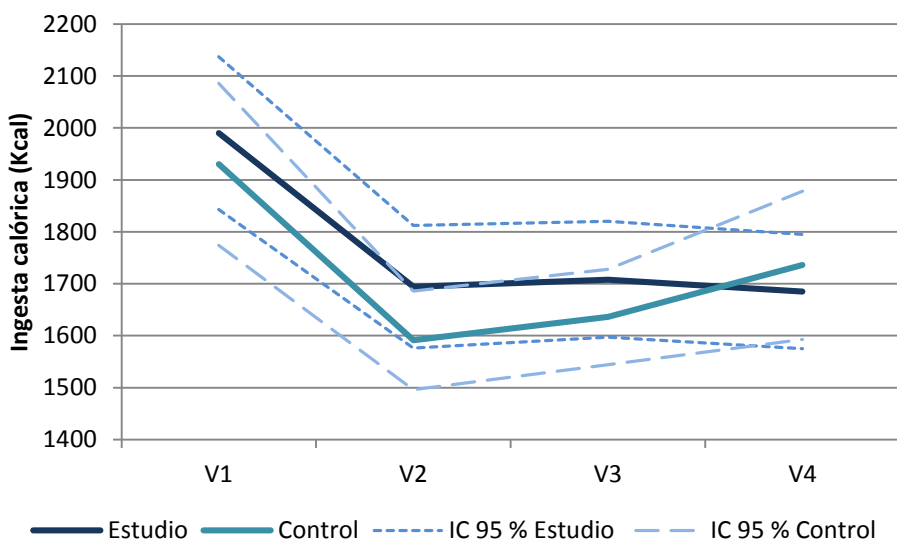


Figura 4.25 - Evolución de la ingesta calórica total a lo largo del estudio por grupos.
Visita $p = 0.0010$. Grupo $p = 0.4770$. Visita por grupo $p = 0.5080$

También se han evaluado diferentes parámetros de la dieta para determinar los posibles beneficios que la inclusión de la bebida de estudio podría suponer sobre la calidad de la dieta.

Con ello se ha observado una interacción significativa (interacción visita x grupo/tratamiento $p < 0.05$) entre el consumo de la bebida estudio y la ingesta de fibra, riboflaina, niacina, vitamina B6, B12, ácido fólico y vitamina E, lográndose de este modo compensar el descenso en el consumo de estos nutrientes y vitaminas observado en cambio en el grupo control y condicionado por la restricción calórica de la dieta indicada. Del mismo modo esto se ha observado para el calcio, hierro, zinc, magnesio y selenio como se puede ver la tabla 4.30.

Tabla 4.30 - Evolución de la ingesta de nutrientes a lo largo del estudio por visitas y grupos (X ± DT)

	Estudio				Control				Efecto		
	V1	V2	V3	V4	V1	V2	V3	V4	visita	grupo	visita x grupo
Fibra vegetal (g)	19.38 (7.75)	24.64 (8.67)	23.99 (6.97)	23.71 (7.31)	19.88 (7.33)	20.39 (7.03)	20.54 (6.81)	18.52 (5.43)	0	0.021	0.001
Riboflavina (mg)	1.79 (0.57)	1.82 (0.45)	1.84 (0.5)	1.96 (0.58)	1.75 (0.54)	1.47 (0.43)	1.43 (0.44)	1.55 (0.61)	0.036	0.001	0.003
Niacina (mg)	33.54 (9.54)	35.5 (8.42)	38.33 (10.01)	37.78 (10.07)	34.59 (9.36)	31.39 (7.07)	31.09 (8.95)	32.62 (8.94)	0.496	0.008	0.002
Vitamina B6 (mg)	2.15 (0.83)	2.4 (0.75)	2.44 (0.76)	2.43 (0.64)	2.09 (0.56)	2.02 0.63()	2.03 (0.74)	1.95 (0.67)	0.564	0.004	0.068
Ácido Fólico (µg)	252.68 (84.34)	295.14 (87.25)	314.88 (94.48)	297.72 (95.6)	257.35 (92.72)	262.27 (85.62)	264.87 (90.2)	239.93 (91.89)	0.015	0.018	0.024
Vitamina B12 (µg)	6.89 (4.27)	6.13 (3.79)	7.44 (7.39)	6.16 (4.09)	6.87 (3.91)	5.14 (3.69)	4.18 (2.28)	4.24 (2.25)	0.057	0.005	0.059
Vitamina E (mg)	7.16 (2.32)	10.09 (2.46)	9.68 (1.86)	10.03 (3.62)	8.19 (3.82)	6.47 (4.26)	6.64 (2.22)	7.03 (3.02)	0.096	<0.001	<0.001
Calcio (mg)	846.41 (281.8)	867.33 (181.7)	853.71 (186.6)	923.26 (272)	837.41 (351.1)	710.12 (192.8)	723.6 (305.6)	782 (283.4)	0.101	0.009	0.078
Hierro (mg)	13.72 (4.51)	15.13 (3.92)	15.31 (4.03)	16.64 (4.83)	13.36 (3.14)	11.96 (3.76)	12.6 (3.22)	12.79 (4.34)	0.044	<0.001	0.002
Zinc (mg)	9.76 (2.79)	10.35 (3.02)	9.83 (1.9)	10.50 (2.52)	9.19 (2.51)	7.53 (2.02)	7.54 (2.08)	8.06 (2.28)	0.077	<0.001	0.001
Magnesio (mg)	266.34 (75.75)	285.84 (72.26)	280.36 (61.2)	290.60 (74.66)	285.68 (71.45)	256.85 (72.06)	262.23 (69.17)	262.27 (77.09)	0.873	0.226	0.011
Selenio (µg)	97.64 (33.36)	106.4 (32.44)	108.8 (30.99)	107.73 (34.96)	99.71 (35.74)	88.85 (24.53)	84.36 (24.67)	93.67 (24.44)	0.801	0.004	0.012

***Efecto visita:** indica la evolución en un mismo grupo desde el inicio al fin de la intervención.

Efecto grupo: indica las diferencias entre grupos independientemente del tiempo.

Efecto visita x grupo: indica las diferencias de evolución entre grupos como consecuencia del tratamiento recibido. El p valor de la interacción se ha ajustado por sexo, por el % de consumo de los batidos, por el VCT de la dieta realizada en relación a la indicada y los METs del ejercicio realizado en relación a la media (para minimizar las diferencias del efecto de esas variables).

Valores resaltados, post hoc <0.05

Del ejercicio físico

Con el objetivo de evitar que las diferencias que han podido observarse entre grupos se hayan debido a un cumplimiento diferente del ejercicio físico recomendado a los grupos, se ha evaluado el grado de actividad física por visitas y grupos.

En el análisis de medidas repetidas, como puede observarse en la figura 4.26, se aprecia una interacción en el límite de la significación ($p = 0.064$), interacción visita por tratamiento, marcado fundamentalmente por el descenso observado en la actividad física en el grupo estudio en relación al control [1570.6 (DT: 1103) vs 23975 (DT: 3116) METs/día], aspecto importante a tener en cuenta en la interpretación de los resultados obtenidos.

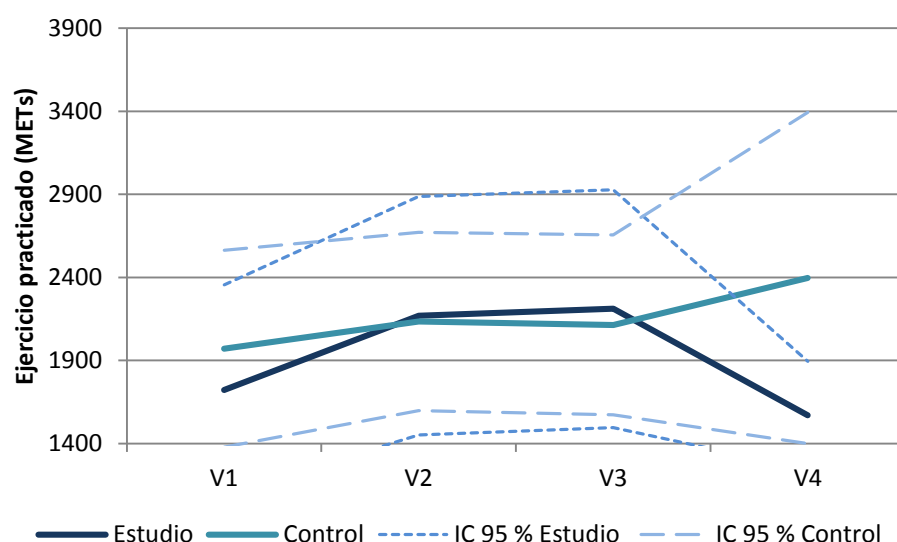


Figura 4.26 - Evolución del ejercicio practicado expresado en METs a lo largo del estudio por grupos.
Visita $p = 0.2160$. Grupo $p = 0.5870$. Visita por grupo $p = 0.064$.

4.3.2.5 Percepción sensorial de la bebida

La tabla 4.31 resume las puntuaciones obtenidas en cada uno de los aspectos valuados en relación a la percepción sensorial del producto por visita. No se han observado diferencias significativas entre grupos en ninguna de las categorías evaluadas.

A diferencia de lo esperado, las puntuaciones de ganas de consumir el batido han tendido a aumentar a lo largo de la intervención ($p = 0.08$) y la aceptación del sabor y consistencia también ha aumentado de forma significativa ($p = 0.002$ y 0.008 respectivamente) sin diferencias de comportamiento entre grupos.

Tabla 4.31 - Puntuaciones obtenidas en la valoración sensorial en función del producto consumido ($X \pm DT$)

%	Estudio			Control			<i>p</i>		
	v1-v2	v2-v3	v3-v4	v1-v2	v2-v3	v3-v4	visita	grupo	Visita x grupo
Ganas de consumirlo	69.2 \pm 23.7	70.8 \pm 22.6	69.3 \pm 22.7	65.8 \pm 21.1	71.4 \pm 18.5	73.6 \pm 22.1	0.088	0.861	0.106
Sabor	67.7 \pm 25.0	73.3 \pm 23.3	72.7 \pm 24.1	71.2 \pm 22.8	74.6 \pm 21.0	75.1 \pm 20.8	0.002	0.566	0.892
Olor	65.8 \pm 26.3	68.9 \pm 24.3	67.5 \pm 25.9	72.8 \pm 21.1	74.8 \pm 20.0	77.1 \pm 19.6	0.24	0.096	0.66
Consistencia	71.4 \pm 25.1	69.2 \pm 24.2	76.6 \pm 23.2	73.8 \pm 22.0	73.5 \pm 20.9	77.3 \pm 19.0	0.008	0.603	0.691
Efectividad esperada	63.8 \pm 27.3	67.3 \pm 28.5	65.2 \pm 29.5	66.4 \pm 23.5	65.5 \pm 24.4	68.1 \pm 22.6	0.625	0.828	0.254

*Efecto visita: indica la evolución en un mismo grupo desde el inicio al fin de la intervención.

Efecto grupo: indica las diferencias entre grupos independientemente del tiempo.

Efecto visita x grupo: indica las diferencias de evolución entre grupos como consecuencia del tratamiento recibido. *p* valor significativo < 0.05.

4.3.2.6 *Análisis genético sobre la respuesta al consumo de la bebida láctea*

Dadas las características del estudio, se ha realizado una sub-selección de 64 SNPs pertenecientes a 41 genes, 7 involucrados en procesos inflamatorios, 10 involucrados en rutas del metabolismo lipídico, 14 relacionados con obesidad y 10 con enfermedad cardiovascular.

Las frecuencias por genotipos y alelos, así como el equilibrio de *Hardy-Weinberg*, se muestran en la tabla 4.32, para determinar las características genéticas de los dos grupos de tratamiento evaluados.

Tabla 4.32 - Distribución de genotipos y frecuencias alélicas en 85 sujetos con sobrepeso y obesidad

Gen	Símbolo	dbSNP ID	Funcionalidad	Genotipo			Alelo Minoritario (%)	Equilibrio de Hardy-Weinberg <i>p</i> -Valor
				Homocigoto Común (%)	Heterocigoto (%)	Homocigoto variante (%)		
Genes relacionados con la obesidad								
Adenosina deaminasa específica de RNA,2	ADARB2	rs2805533	<i>intron</i>	26.74	47.67	25.58	49.42	0.7843
Adiponectina	ADIPOQ	rs1501299	<i>intron</i>	47.67	45.35	6.98	29.65	0.5447
Adiponectina	ADIPOQ	rs266729	<i>near gene 5´</i>	56.82	38.64	4.55	23.86	0.7186
Adiponectina	ADIPOQ	rs17300539	<i>nearGene-5</i>	77.01	19.54	3.45	13.22	0.3299
Adiponectina	ADIPOQ	rs2241766	<i>cds-synon</i>	63.64	32.95	3.41	19.89	0.9302
Adiponectina	ADIPOQ	rs182052	<i>intron</i>	42.05	44.32	13.64	35.80	0.8668
Proteína de susceptibilidad a cáncer de mama tipo 2	BRCA2	rs144848	<i>missense</i>	49.43	40.23	10.34	30.46	0.7814
Proteína implicada en la regulación de los ritmos circadianos	CLOCK	rs1801260	<i>UTR 3´</i>	56.82	34.09	9.09	26.14	0.38
Proteína implicada en la regulación de los ritmos circadianos	CLOCK	rs3749474	<i>UTR-3</i>	51.16	36.05	12.79	30.81	0.2164
Proteína implicada en la regulación de los ritmos circadianos	CLOCK	rs4580704	<i>intron</i>	38.64	38.64	22.73	42.05	0.0752
Proteína asociada con la obesidad y masa grasa	FTO	rs9939609	<i>intron</i>	35.23	52.27	12.5	38.64	0.4289
Proteína asociada con la obesidad y masa grasa	FTO	rs8050136	<i>intron</i>	32.95	53.41	13.64	40.34	0.3889
Glucagón	GCG (GLP1)	rs4664447	<i>intron</i>	94.19	5.81	0	2.91	0.1109
Grelina	GHRL	rs4684677	<i>missense</i>	90.91	7.95	1.14	5.11	0.5052
Grelina	GHRL	rs2075356	<i>intron</i>	82.76	17.24	0	8.62	0.7781
Polipeptido inhibidor gástrico	GIP	rs2291726	<i>intron</i>	28.74	48.28	22.99	47.13	0.8879
Lactasa	LCT (MCM6)	rs4988235	<i>intron</i>	44.87	44.87	10.26	32.69	0.9446
Receptor de leptina	LEPR	rs8179183	<i>missense</i>	63.22	36.78	0	18.39	0.0718
Receptor de leptina	LEPR	rs1137100	<i>missense</i>	60.92	31.03	8.05	23.56	0.2938

Receptor de leptina	LEPR	rs1137101	<i>missense</i>	36.36	43.18	20.45	42.05	0.3654
Receptor de la melanocortina 4	MC4R	rs12970134	<i>ND</i>	55.56	37.04	7.41	25.93	0.9105
Neuropéptido Y	NPY	rs16147	<i>near gene 5'</i>	29.55	50	20.45	45.45	0.9209
Neuropéptido Y	NPY	rs5574	<i>cds-synon</i>	33.33	49.43	17.24	41.95	0.9506
Perilipina 1	PLIN1	rs1052700	<i>UTR-3</i>	44.83	41.38	13.79	34.48	0.5454
Proopiomelanocortina	POMC	rs6713532	<i>intron</i>	50	40.7	9.3	29.65	0.9462
Proopiomelanocortina	POMC	rs2071345	<i>cds-synon</i>	98.86	1.14	0	0.57	0.9573
Genes relacionados con la enfermedad cardiovascular								
Receptor de estrógenos 1	ESR1	rs2234693	<i>intron</i>	30.68	47.73	21.59	45.45	0.8434
Receptor de estrógenos 1	ESR1	rs9340799	<i>intron</i>	36.05	51.16	12.79	38.37	0.5573
Receptor de estrógenos 2	ESR2	rs1256049	<i>cds-synon</i>	93.18	6.82	0	3.41	0.2111
Proteína reguladora de la glucoquinasa	GCKR	rs780094	<i>intron</i>	34.09	42.05	23.86	44.89	0.212
Subunidad beta de la proteína G 3	GNB3	rs2301339	<i>intron</i>	37.93	49.43	12.64	37.36	0.7249
Subunidad beta de la proteína G 3	GNB3	rs5443	<i>cds-synon</i>	35.29	51.76	12.94	38.82	0.512
Metilen-tetrahidrofoloreductasa	MTHFR	rs1801133	<i>missense</i>	35.23	42.05	22.73	43.75	0.2282
Óxido nítrico sintasa u óxido nítrico sintasa endotelial	NOS3 (eNOS)	rs1799983	<i>missense</i>	38.37	44.19	17.44	39.53	0.5932
Lipoproteínas de baja densidad oxidadas	ORL1/LOX-1	rs3736235	<i>intron</i>	25.00	51.14	23.86	49.43	0.9392
Periodo circadiano 2	PER2	rs4663302	<i>ND</i>	48.86	35.23	15.91	33.52	0.0748
Periodo circadiano 2	PER2	rs2304672	<i>UTR 5</i>	88.75	11.25	0	5.62	0.623
Periodo circadiano 2	PER2	rs934945	<i>missense</i>	63.16	28.95	7.89	22.37	0.2375
Paraoxonasa 1	PON1	rs662	<i>missense</i>	50.00	42.05	7.95	28.98	0.9491
Inhibidor del activador del plasminógeno-1	SERPINE1 (PAI1)	rs6092	<i>missense</i>	81.61	17.24	1.15	9.77	0.7136
Genes involucrados en procesos inflamatorios								
Proteína C reactiva	CRP	rs1130864	<i>UTR 3'</i>	46.51	47.67	5.81	29.65	0.2622
Proteína C reactiva	CRP	rs1800947	<i>cds-synon</i>	93.18	6.82	0	03.41	0.2111
Interferón gamma inducible 30	IFI30	rs11554159	<i>missense</i>	50.59	41.18	8.24	28.82	0.8501

Interleuquina 6	IL6	rs1800797	<i>near gene 5'</i>	46.34	29.27	24.39	39.02	0,0009
Interleuquina B1	ILB1	rs1143623	<i>nearGene-5</i>	52.27	40.91	6.82	27.27	0.9189
Selectina E	SELE	rs5368	<i>missense</i>	81.61	17.24	1.15	09.77	0.7136
Factor de necrosis tumoral α	TNF – α	rs1800629	<i>near gene 5'</i>	79.55	20.45	0	10.23	0.5803
Factor de necrosis tumoral α	TNF – α	rs1799724	<i>nearGene-5</i>	65.91	34.09	0	17.05	0.1082
Súperfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral miembro 1A	TNFRSF1A	rs767455	<i>cds-synon</i>	39.08	47.13	13.79	37.36	0.9007
Genes involucrados en el metabolismo lipídico								
Transportador dependiente de la unión de ATP	ABCA1	rs2575875	<i>intron</i>	34.09	46.59	19.32	42.61	0.7755
Transportador dependiente de la unión de ATP	ABCA1	rs4149272	<i>intron</i>	36.78	44.83	18.39	40.80	0.6122
Transportador dependiente de la unión de ATP	ABCA1	rs2230806	<i>missense</i>	56.32	36.78	6.9	25.29	0.9434
Apolipoproteína B	APOB	rs512535	<i>nearGene-5</i>	33.33	49.43	17.24	41.95	0.9506
Apolipoproteína B	APOB	rs693	<i>cds-synon</i>	27.59	50.57	21.84	47.13	0.9533
Apolipoproteína E	APOE	rs429358	<i>missense</i>	81.61	17.24	1.15	9.77	0.7136
Apolipoproteína E	APOE	rs7412	<i>missense</i>	88.64	11.36	0	5.68	0.6844
Apolipoproteína E	APOE/apoc1	rs405509	<i>near gene 5</i>	29.07	46.51	24.42	47.67	0.6389
Proteína de unión a ácidos grasos 2	FABP2	rs1799883	<i>missense</i>	59.77	34.48	5.75	22.99	0.9421
Lipasa hepática	LIPC	rs1800588	<i>nearGene-5</i>	52.87	42.53	4.6	25.86	0.4272
Lipoproteína Lipasas	LPL	rs328	<i>STOP-GAIN</i>	81.71	18.29	0	9.15	0.7439
Receptores activadores de la proliferación de peroxisomas α	PPARA	rs135549	<i>intron</i>	29.41	58.82	11.76	41.18	0.0708
Receptores activadores de la proliferación de peroxisomas γ	PPARG	rs3856806	<i>cds-synon</i>	78.16	20.69	1.15	11.49	0.739
Receptores activadores de la proliferación de peroxisomas γ	PPARG	rs1801282	<i>missense</i>	82.89	17.11	0	8.55	0.8471
Receptor de las lipoproteínas de alta densidad HDL	SCARB1	rs4238001	<i>missense</i>	61.54	33.85	4.62	21.54	0.7594
<p><i>p</i>, valor de comparación de frecuencias, 0.05 para considerarse diferencia estadísticamente significativa.</p> <p>* El valor ha sido calculado mediante el test exacto debido a que el número de heterocigotos y homocigotos variantes ha sido muy reducido y la <i>p</i> no era representativa. El resto de datos han sido analizados mediante el test el test Chi2 ($p > 0.05$).</p> <p>ND, dato no disponible.</p>								

Como se puede ver en la tabla anterior, la distribución genotípica de la variante IL6 rs1800797 ($p = 0.0009$), se ha desviado del equilibrio de *Hardy-Weinberg* ($p < 0.05$).

Las frecuencias que han resultado se mantienen en consonancia con las frecuencias obtenidas en el Proyecto HapMap para la población CEU (Residentes de Utah con ancestros del norte y oeste de Europa).

En el análisis se ha observado que los polimorfismos que se han mostrado en la tabla 4.33, se encuentran en desequilibrio de ligamiento, lo que implica que están asociados y se pueden heredar de forma conjunta.

Tabla 4.33 - Variantes genéticas estudiadas en desequilibrio de ligamiento				
Gen	Símbolo	Variante 1	Variante 2	Desequilibrio Ligamiento
Transportador dependiente de la unión de ATP	ABCA1	rs2575875	rs4149272	0.79
Receptor de estrógenos 1	ESR1	rs2234693	rs9340799	0.78
Proteína asociada con la obesidad y masa grasa	FTO	rs9939609	rs8050136	0.87
Subunidad beta de la proteína G 3	GNB3	rs2301339	rs5443	1
Neuropéptido Y	NPY	rs16147	rs5574	0.85
Se ha considerado desequilibrio de ligamiento cuando el resultado del equilibrio ha sido superior a 0.7.				

No se han encontrado diferencias significativas entre grupos de tratamiento y genotipos de los polimorfismos estudiados con respecto a los valores basales de: peso, IMC, grasa, masa muscular, grasa visceral, cintura, cadera, presión arterial, glucosa, insulina, HOMA, HbA1c, HbA1c, colesterol total, HDL, LDL, TG, ApoA, ApoB1 y cocientes: CT/HDL, LDL/HDL y ApoB1/ApoA, salvo en las siguientes excepciones: en el polimorfismo CRP rs1130864 para HbA1c ($p = 0.0449$); en el polimorfismo PPARA rs135549 para grasa total (%) ($p = 0.0370$) y masa muscular (%) ($p = 0.0119$).

Después del análisis de medidas repetidas ajustado por las 64 variantes genéticas, los resultados de interacción han resultado significativos para el cambio de peso en el polimorfismo LCT (MCM6) rs4988235 ($p = 0.0488$) con respecto al tipo de tratamiento. A su vez, como se puede ver en la tabla 4.34, también se ha apreciado una tendencia para el IMC ($p = 0.0560$) para este mismo polimorfismo, así como para el peso ($p = 0.0860$) e IMC ($p = 0.0820$) en el caso del ADARB2 rs2805533, con respecto al tipo de tratamiento.

Sin embargo, después del análisis *post-hoc* por comparaciones múltiples, donde se ha ajustado por 64, estos polimorfismos no han mostrado una diferencia estadísticamente significativa sobre el peso e IMC, en ninguno de los genotipos, lo que indica que el cambio producido no se ha debido a diferencia entre genotipos con respecto a los dos grupos de tratamiento.

Tabla 4.34 - Cambio de Peso e IMC

Tabla 4.34 - Cambio de Peso e IMC							
Modelo Dominante			Homocigoto Común	Heterocigoto + Homocigoto Variante		Homocigoto Común	Heterocigoto + Homocigoto Variante
			Media (IC 95 %)	Media (IC 95 %)	<i>p</i> Interac.	<i>Post-Hoc</i> (<i>p</i> valor ajustado)	
Peso (kg)	LCT (MCM6) rs4988235	Estudio	-4.171(-5.58 - -2.762)	-1.879(-2.741 - -1.017)	0.0488	1	1
		Control	-1.993(-3.459 - -0.527)	-3.758(-5.201 - -2.315)			
IMC	LCT (MCM6) rs4988235	Estudio	-1.552(-2.109 - -0.995)	-0.725(-1.033 - -0.417)	0.0579	1	1
		Control	-0.727(-1.258 - -0.196)	-1.4(-1.953 - -0.847)			
Peso (kg)	ADARB2 rs2805533	Estudio	-3.933(-6.038 - -1.828)	-2.469(-3.216 - -1.722)	0.0858	1	1
		Control	-1.089(-1.849 - -0.329)	-3.917(-5.162 - -2.672)			
IMC	ADARB2 rs2805533	Estudio	-1.475(-2.3 - -0.65)	-0.93(-1.195 - -0.665)	0.0823	1	1
		Control	-0.378(-0.647 - -0.109)	-1.447(-1.912 - -0.982)			
<p>p Aj, p valor de asociación de la variante genética sobre el parámetro estudiado, ajustado por 64 SNPs.</p> <p>p Int. AJ, p valor de interacción para el polimorfismo y el sexo sobre el parámetro estudiado, ajustado por 64 SNPs.</p> <p>Se consideraron que existían diferencias estadísticamente significativas cuando el p valor era menor de 0.05.</p>							

5. DISCUSIÓN

5 DISCUSIÓN

5.1 DISCUSIÓN DE LA CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE LA POBLACIÓN DE LA PLATAFORMA CANTOBLANCO PARA ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN Y ENSAYOS CLÍNICOS DE INTERVENCIÓN

5.1.1 DISCUSIÓN DE LA CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

5.1.1.1 *Discusión de las características generales, sociodemográficas y socioeconómicas de la población estudiada*

La Organización Mundial de la Salud, en un informe publicado en el año 2009, enumeró los hábitos dietéticos y de estilo de vida como factores causantes de aproximadamente el 60 % de las enfermedades en Europa ²⁴³. El conocimiento, por tanto, de las características de la población en relación a sus hábitos de alimentación y estilo de vida, puede ayudar a la identificación de sus necesidades, con el objetivo de prevenir de forma más óptima las enfermedades relacionadas con la nutrición mediante unas recomendaciones más personalizadas.

La muestra categorizada en la Plataforma de Genómica Nutricional y Alimentación, con respecto a la edad y el sexo, ha resultado una población mayoritariamente joven y predominantemente femenina. Dichos resultados se han debido al lugar donde se ha llevado a cabo el reclutamiento, principalmente en el *campus* universitario. Dicha muestra ha presentado características similares a las pertenecientes en la cohorte prospectiva con 9408 sujetos analizados, llevada a cabo en el Proyecto Seguimiento Universidad de Navarra (SUN)

²⁴⁴.

5.1.1.2 *Discusión sobre las características socio-sanitarias del colectivo estudiado*

Los resultados obtenidos de la muestra sobre las características socio-sanitarias revelan una población fundamentalmente sana, poco medicada, aunque con antecedentes familiares relativos a enfermedades cardiovasculares, obesidad, diabetes y cáncer, no menospreciables.

Según las estadísticas del Movimiento Natural de la Población (del Instituto Nacional de Estadística), la evolución de la esperanza de vida en la Comunidad de Madrid ha ido en aumento a lo largo de los años, tanto en el total de la población (media de 84.22 años en 2014) como en ambos sexos (mujeres con una media de 86.61 años, y hombres 81.46 años). Este valor, además se encuentra por encima de la media total española que se sitúa en los 82.9 años. A su vez, la Dirección General de Sistemas de Información Sanitaria de la Consejería de Sanidad, indica que en el año 2014 el número de consultas de medicina de familia fue menor (27.86 millones), que en el año 2010 donde se registraron 30.21 millones. Esta disminución también se ha observado sobre el número de consultas pediátricas. Con respecto a los centros de servicios sociales, la Secretaría General Técnica de la Consejería de Políticas Sociales y Familia, indica un aumento de centros del 2014 a 2015, alcanzando los 2057 centros en toda la Comunidad de Madrid ^{245 246}.

Dichos datos sugieren unas características socio-sanitarias moderadamente buenas, condicionantes de la salud de la población estudiada, que se puede decir, cuenta con una buena asistencia sanitaria y nivel de salud.

Dadas las características de la población mencionadas en el apartado anterior, así como la situación sociosanitaria, las enfermedades asociadas a problemas metabólicos y el consumo de medicación de la población estudiada se encuentran por debajo de la media de la población general. Así, mientras que la prevalencia de hipercolesterolemia en la población española alcanza niveles elevados (donde se estima que el 18 % de la población entre 35 y 64 años de edad, presenta unos niveles de colesterol en sangre igual o superiores a 250 mg/dl, y el 58 % igual o superior a 200 mg/dl) estos valores se encuentran muy por debajo en el caso de la población estudiada. Con respecto a la prevalencia de diabetes *mellitus*, sobre todo referida a la diabetes *mellitus* tipo 2, estudios realizados en España estiman una prevalencia del 10 %, sin contar con los casos de diabetes no conocida, una cifra muy superior a la obtenida en la población estudiada ²⁴⁷. Esta baja prevalencia de enfermedad podría estar asociada a la procedencia de la población reclutada (*campus* universitario) por un lado, y por otro, a las características que poseen los sujetos voluntarios que participan en estudios nutricionales, ya que, por lo general, resultan más concienciados por su estado de salud a la vez que tienen estilos de vida más saludables, en comparación con el total de la población.

Sin embargo, uno de los factores limitantes a la hora de establecer la prevalencia de determinadas enfermedades en la población, es el mero desconocimiento de las mismas, lo

que genera una subestimación de los valores reales de las mismas. En nuestro caso, aunque al tratarse de una población fundamentalmente sana, la prevalencia de enfermedades y consumo de fármacos no es equiparable a la población general, se hace necesario tener dicho sesgo en cuenta, y evaluar estos datos junto con los resultados obtenidos mediante pruebas bioquímicas.

En el caso de los factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares, tales como la hipercolesterolemia y la hipertrigliceridemia, en algunos casos están asociados a un componente hereditario. La hipercolesterolemia familiar es una de las enfermedades que se pueden englobar dentro de este grupo ya que se produce debido a una alteración genética que produce una alteración en el metabolismo de las lipoproteínas de baja densidad. Este desequilibrio genera una menor síntesis del receptor de LDL provocando una disminución en la capacidad para retirar las LDL y por tanto se produce una elevación de los niveles en sangre ³⁵. De hecho, según la clasificación desde el punto de vista etiopatogénico, se intenta clasificar hiperlipemias en función de alteraciones genéticas y patogénicas, existiendo una relación entre las formas primarias y los antecedentes familiares. Según la Fundación Hipercolesterolemia Familiar, una persona con hipercolesterolemia familiar, tiene un 50 % de probabilidades de transmitir el gen anormal a sus descendientes. Sin embargo, también cabe resaltar que la expresión fenotípica de dicho genotipo está determinada al parecer en un alto grado, con factores ambientales, considerándose en la mayoría de los casos de causa multifactorial ²⁴⁸.

Los resultados del estudio han mostrado una asociación estadísticamente significativa entre los antecedentes familiares de dislipemia y los casos reportados de sujetos que actualmente tienen dicha patología. De esta manera, el 28.57 % de la población estudiada con antecedentes familiares de dislipemia, también han afirmado tener dicho trastorno actualmente. Actualmente, se conocen más de 1.600 mutaciones diferentes a lo largo de todo el gen que codifica el receptor del LDL en individuos con hipercolesterolemia familiar procedentes de diversas poblaciones a nivel mundial ²⁴⁹, por lo que es esperable encontrar una asociación positiva sobre el riesgo de padecer dislipemia, teniendo antecedentes familiares. Por ello, se hace necesario destacar el interés sobre uso y desarrollo de herramientas genómicas para detectar el riesgo a desarrollar enfermedades futuras y a poner en marcha mecanismos de prevención.

5.1.1.3 *Discusión sobre los estilos de vida*

La práctica de unos estilos de vida inadecuados, pueden conllevar por tanto a trastornos de ansiedad y depresión siendo estos, una de las causas más frecuentes de consulta en Atención Primaria y representan uno de los principales problemas de salud en nuestro país ²⁵⁰.

En la población estudiada, la mayor parte no ha reportado ningún tipo de trastorno psicológico, sin embargo, un 31.97 % de la población considera que padece estrés, y el 15.88 % de la población que padece ansiedad. A su vez, se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres con respecto a la ansiedad, siendo mucho más elevado el número de mujeres que se han considerado con ansiedad, con respecto a los hombres.

Aunque la prevalencia a nivel internacional de los trastornos de ansiedad varía ampliamente entre los diferentes estudios epidemiológicos publicados, existen varios factores que explican la heterogeneidad de dichas diferencias, como son los criterios y evaluación del diagnóstico, el tamaño de la muestra y el país estudiado. Los porcentajes estimados de prevalencia al año y prevalencia a lo largo de la vida para los trastornos de ansiedad, se encuentran alrededor de un 10.60 % y un 16.60 % respectivamente. Sin embargo, si los estudios se realizan entre los usuarios que acuden a consultas de Atención Primaria, la prevalencia aumenta, oscilando entre el 20.00 % y 40.00 % ²⁵⁰.

Los datos obtenidos y los datos reportados en otros estudios muestran por tanto cierta relación, lo que da a entender que los estilos de vida de las sociedades industrializadas frecuentemente están caracterizados por falta de tiempo, prisas, presión, y otros condicionantes que llegan a alterar la salud mental de la población afectando de forma significativa a su calidad de vida. Los trastornos psicológicos cada vez son más frecuentes y suponen una elevada carga económica y social, tanto por su frecuencia, coexistencia y comorbilidad, como por la discapacidad que producen. ²⁵⁰

Con respecto al hábito tabáquico, según el Sistema de Información de Factores de Riesgo asociados a Enfermedades no Transmisibles en población adulta (SIVFRENT-A), la población de entre 18 y 64 años, ha disminuido el consumo de tabaco desde el año 2011 a 2013, que representa en torno al 3.20 %. De esta manera, en el año 2013 el 27.40 % de la población de 18 a 64 años eran fumadores habituales ²⁵¹.

En la población estudiada, se ha observado que la mayoría (85.40 %) ha reportado no consumir nada de tabaco. Estos datos son mucho más positivos que lo que reportan los informes sobre el estado de salud de la población, por lo que estos datos pueden encontrarse sesgados, debido al tipo de población reclutada más concienciada por la salud, que la población general.

Con respecto a los hábitos referidos al consumo de alcohol, cabe destacar que se trata de una sustancia psicoactiva con propiedades causantes de dependencia, la cual se ha utilizado ampliamente en muchas culturas durante siglos. El consumo de esta sustancia se considera causante de una amplia variedad de enfermedades y trastornos ²⁵².

En la población estudiada, el porcentaje de consumo de alcohol es más elevado en hombres que en mujeres, así como la edad de comienzo de consumo. A su vez, los datos muestran que el porcentaje de consumo de bebidas fermentadas es considerablemente mayor que el consumo de bebidas destiladas.

Suponiendo que una copa de vino y 1/5 de cerveza contienen aproximadamente 10 g de alcohol, y que una copa de licores destilados contiene 20 g ²⁵³, el consumo medio semanal en hombres se estima en 79.80 g de alcohol (53.20 g perteneciente a bebidas fermentadas, y 26.60 g perteneciente a bebidas destiladas). En el caso de las mujeres, el consumo medio se estima en 39.2 g (30.80 g en bebidas fermentadas y 8.40 g en bebidas destiladas). El consumo medio se estima en 59.50 g.

Estos datos, siguen la misma tendencia que los reportados en otros informes, en los que el consumo medio semanal per cápita de alcohol fue 45.30 g (63.70 g en hombres y 27.20 g en mujeres). Sin embargo, cabe destacar que aunque los datos siguen la misma tendencia, la cantidad de alcohol en gramos es más elevada en toda la población estudiada (y por subgrupos) que la documentada en el Sistema de Vigilancia de Factores de Riesgo Asociados a Enfermedades No Transmisibles en población Adulta de 2011 ²⁵⁴. Una posible causa de estas diferencias es la diferencia cronológica de la recopilación de datos, lo que daría a entender una progresión desfavorable relativa al consumo de alcohol, si bien es cierto que la tendencia de los indicadores de consumo de alcohol muestra, en líneas generales, una evolución favorable entre 1995-1996 y 2010-2011, especialmente en los hombres. ²⁵⁴ Otro posible factor acerca de las cifras aumentadas puede ser de nuevo el tipo de población estudiada que, mayormente perteneciente a la comunidad universitaria. Sin embargo, esta información no deja de ser desalentadora, ya que puede indicar que la percepción de la población es que el consumo de alcohol no está relacionado al estado de salud.

La inactividad física se considera actualmente el cuarto factor de riesgo de mortalidad más importante en todo el mundo, por detrás de la hipertensión, el hábito tabáquico y niveles de glucosa en sangre elevados²⁵⁵. Por tanto, llevar una vida activa conlleva múltiples beneficios sobre la salud de la población.

Los resultados obtenidos relativos a la actividad física muestran que más de un tercio de sujetos se han clasificado como sedentarios de acuerdo a las recomendaciones de la Asociación americana del corazón ¹⁹⁷, y en el caso de la población masculina, este porcentaje de sedentarios es menor que en la población femenina. Esto supone un 64.24 % de población clasificada como activa, cifra que se asemeja con la encuesta de nutrición de la Comunidad de Madrid (2014), donde el 65.50 % de la población se clasificó como activa ²⁴³, e igualmente la población masculina se consideró más activa que la femenina. Los datos, sin embargo, no son muy alentadores ya que la muestra estudiada corresponde a una población adulta relativamente joven, la cual se supone debería ser más activa que el total de la población (donde se incluyen personas con más edad). Según las recomendaciones mundiales sobre la actividad física para la salud publicadas por la OMS, indican la práctica de como mínimo 150 minutos semanales de actividad física aeróbica, de intensidad moderada, o bien 75 minutos de actividad física aeróbica vigorosa cada semana, o bien una combinación equivalente de actividades moderadas y vigorosas ²⁵⁶.

Sin embargo, según los Indicadores Clave del Sistema de Salud (2016), la prevalencia de sedentarismo por 100 habitantes mayores de 15 años durante el periodo comprendido entre 2011-2012 ha sido de 62.90, frente a la media española que ha resultado 58.70 ²⁴⁵. Estos valores se encuentran invertidos con respecto a los anteriores, lo que hace suponer una gran subjetividad en los métodos de obtención de medias de niveles actividad física. A parte de la metodología, se puede mencionar otro sesgo a tener en cuenta, relativo a la deseabilidad social, que potencia la sobreestimación de su percepción sobre los niveles y tiempo de práctica de actividad física, dado el fomento de la misma y la información sobre sus beneficios sobre todo en un colectivo con las mismas características. Otra causa puede ser la mencionada anteriormente, que la población voluntaria se encuentra más concienciada con la salud y por tanto sus niveles de actividad física son mal elevados con respecto a la población general.

5.1.1.4 *Discusión sobre las medidas antropométricas y constantes vitales*

Para poder llevar a cabo estudios de intervención nutricional de forma más precisa, se hace imprescindible disponer de una población caracterizada en función de su antropometría, a parte del resto de características fenotípicas, que se adecue a los criterios de elegibilidad de la población de estudio establecidos en los criterios de inclusión y exclusión, ya que hace que sea más fácil el control de sesgos y suelen aumentar la validez interna,²⁵⁷.

En los resultados encontrados en la población estudio, existe una prevalencia alta de sobrepeso (30.60 % de la población total), y moderada referida a obesidad grado I (16.19 %) de acuerdo a la clasificación del IMC²⁰¹. Sin embargo, al clasificar por sexo, se ha podido observar que en el caso de los hombres las cifras de sobrepeso y obesidad han sido mayores en relación a las mujeres (61.10 % de sobrepeso y obesidad en la población masculina frente a un 49.20 % en la población femenina).

Estos datos, sin embargo, no se corresponden con el grado de actividad física realizada, donde la población masculina se considera más activa. Sin embargo, estas diferencias podrían deberse a la debilidad del IMC para identificar la obesidad al no poder discriminar entre la masa grasa y la masa muscular. La población masculina, por su fisiología y por la práctica de más actividad física presenta mayores niveles de masa muscular lo que puede repercutir en un mayor peso. Este hecho, pone de manifiesto la importancia de tener en cuenta la composición corporal para una evaluación más precisa del estado nutricional²⁵⁸.

A su vez, la población caracterizada ha presentado medias elevadas con respecto al diámetro de la cintura, situándose casi en un 50 % de la población estudiada. Esto permite disponer de una amplia población de personas candidatas de estudios de intervención nutricional relacionados con enfermedades cardiovasculares y síndrome metabólico.

Estos datos siguen la misma tendencia con respecto al contenido de grasa corporal que al igual que el IMC, ha sido elevado en más del 50 % de la población. Según la Sociedad Española para el Estudios de la Obesidad (2000)²⁰¹. El estudio del patrón de distribución de la grasa corporal se considera también muy relevante, por su relación con el riesgo cardiovascular. Así, aunque en la muestra estudiada, un mayor porcentaje de población femenina ha presentado niveles elevados de grasa corporal en comparación con la población masculina; estos niveles no han resultado significativamente diferentes según el género, sin embargo, en el caso de la grasa visceral estos niveles se encuentran invertidos, resultando además significativamente

diferentes entre hombres y mujeres. Dichos resultados se corroboran con estudios similares, que son debidos a las diferencias fisiológicas y de constitución entre género, resultan dichos patrones ²⁵⁹.

Estos resultados sugieren que, aunque la población estudiada presenta una alta proporción de sujetos con sobrepeso y obesidad, evaluados por IMC, como por cantidad de grasa corporal. A su vez, la población masculina presenta mayor riesgo cardiovascular basando en el contenido de grasa visceral que la femenina.

En base a los resultados observados, una detección precoz del riesgo de padecer obesidad y sus complicaciones mediante herramientas como la determinación de polimorfismos genéticos, podría tener gran interés para concienciar a la población e instaurar medidas tempranas de prevención según su riesgo. A su vez, se sugiere la necesidad de llevar a cabo planes de educación nutricional en la población, así como generar una mayor sensibilización en la población y promoción de práctica regular de actividad física ya que se ha observado un porcentaje elevado de población sedentaria, para mejorar su estado nutricional de cara a prevenir enfermedades asociadas a la alimentación. ²⁶⁰

Por otro lado, el riesgo cardiovascular también se evalúa mediante los niveles elevados de presión arterial ²⁶¹. En este caso, sobre la clasificación de la presión arterial, la mayoría de la población presenta niveles normales tanto de presión sistólica como diastólica. Sin embargo, en el caso de la población masculina, la presión sistólica ha presentado mayor porcentaje de hipertensión (23.60 %) y menor en el caso de la población femenina (10.00 %), encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres. Por lo que el riesgo en mujeres se puede ver disminuido por los niveles de presión arterial, y viceversa, en el caso de los hombres, verse aumentado debido a este factor.

5.1.1.5 *Discusión sobre la valoración dietética*

Sabemos que el empleo de registros dietéticos para conocer la ingesta tiene amplias limitaciones, dada la frecuente infravaloración de la ingesta documentada en muchos estudios. No obstante, en el presente estudio, la ingesta energética de la muestra ha presentado unos valores cercanos a los recomendados a la población en función de la edad y el género. ^{262,263}.

Con respecto al consumo de nutrientes, los resultados han mostrado que la población estudiada, tanto hombres como mujeres han realizado una ingesta media elevada de grasas y

baja en hidratos de carbono, alejada de las recomendaciones para la población española ^{190,192}, aunque similar a los datos recogidos en otros estudios sobre población española ²⁶⁴.

Con respecto al consumo de hidratos de carbono, el consumo medio de azúcares en la población total prácticamente ha duplicado a la cantidad recomendada del 10 %. Se han encontrado diferencias estadísticamente significativas para el consumo de azúcares sencillos entre hombres y mujeres, siendo más elevado dicho consumo en la población femenina. El consumo de fibra medio ha sido cercano al recomendado ²⁶⁵.

Respecto a la calidad de la grasa ingerida el perfil de lípidos se aproxima o alcanza las recomendaciones de las mismas ^{61,266}, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre sexos.

En relación a la ingesta de micronutrientes, destaca la deficiencia en vitamina D, donde el 64.74% de la población no cubre la ingesta diaria recomendada de dicho nutriente ¹⁹⁰. Dichos datos, se corresponden con los obtenidos en otras encuestas sobre valoración dietética en las que, aunque los niveles del resto de vitaminas se encuentran en valores por encima de la ingesta recomendada y, en el caso de la vitamina D, los valores se sitúan por debajo de las recomendaciones ^{243,264}. Las ingestas recomendadas para la población general se estiman en 600 UI (15 µg) de vitamina D entre edades de 1 y 70 años y 800 UI por encima de esta edad, lo que corresponde a un nivel sérico de al menos 20 ng/ml (50 nmol/l) ²⁶⁷. Aunque obtenemos la mayor parte de la vitamina D que necesitamos a través de la exposición a la luz solar, una dieta equilibrada y saludable también esencial. Desgraciadamente, muy pocos alimentos contienen Vitamina D. Estas son algunas de las razones de por qué esta deficiencia ha alcanzado proporciones epidémicas. Otro factor es nuestro estilo de vida mayoritariamente llevado a cabo en lugares cerrados.

En lo referente al número de comidas diarias, según diversos estudios, se recomienda realizar de 3-4 colaciones (en algunos casos 5) en lugar de concentrar la ingesta en una o dos comidas diarias, ya que parece que el distribuir adecuadamente los alimentos se asocia con un aporte de energía y nutrientes más adecuado con menos consumo de grasas y, por tanto, a un mejor control de peso corporal ^{268,269}. En la población estudiada se ha observado que más de la mitad de la población estudiada realiza más de tres comidas al día, siendo más frecuente en mujeres que en hombres. Dichos patrones se asemejan a los de otro estudio realizado en población universitaria de Castilla-La Mancha ²⁷⁰.

Esto quizá puede relacionarse con el grado de apetito observado en los sujetos estudiados. Aproximadamente la mitad de la población total ha reflejado sentir un apetito elevado, lo que está relacionado con un mayor peso corporal e ingesta de grasas, sin embargo, un mayor número de sujetos masculinos ha indicado un grado de apetito aumentado, en comparación con las mujeres, lo que quizá podría estar relacionado con el mayor número de comidas diarias realizadas por estas. Sin embargo, dado el carácter subjetivo de los cuestionarios evaluados, para confirmar esta hipótesis sería necesario llevar a cabo más estudios centrados en dichas variables.

Con respecto a los diferentes grupos de alimentos, en general puede observarse que la población estudiada ha realizado un consumo elevado del grupo de las carnes, pescados y huevos, a diferencia de un consumo disminuido con respecto al grupo de cereales. Dichos resultados se asemejan a los obtenidos en estudios previos sobre la población española ²⁶⁴. A su vez, se ha observado que la población masculina realiza un consumo significativo más elevado del grupo carnes, pescados y huevos respecto a las mujeres.

5.1.1.6 *Discusión sobre los parámetros bioquímicos*

Los valores medios de glucosa en sangre se han encontrado dentro de los valores usados como referencia, aunque se ha observado una diferencia significativa entre géneros, resultado más elevados para el género masculino. Varios estudios referencian que los niveles de glucemia varían según el sexo, de manera que los hombres presentan mayores niveles de glucosa plasmática en ayunas así como de hemoglobina glicosilada (HbA1c) que las mujeres ^{271,272}. A su vez, también se han observado diferencias entre la cinética de la glucosa en el ejercicio físico existiendo diferencias entre hombres y mujeres ²⁷³. Por lo que los valores obtenidos en el presente análisis, se muestran en línea con otros estudios dónde igualmente han observado dichas diferencias. Por otro lado, cabe destacar que, según informes, las cifras de glucemia entre la normalidad y lo que se considera diabetes, son muy variables dependiendo del estudio llevado a cabo. Una de las razones que puede explicar dicha variabilidad es la diferencia entre las metodologías y métodos diagnósticos empleados.

Los niveles de colesterol total medios obtenidos, se encuentran cerca de los límites usados como referencia. De hecho, desde el punto de vista de clasificación, casi el 50% de la población estudiada ha mostrado valores de colesterol plasmático mayores a 200 mg/dl. Estos datos, coinciden a los obtenidos en el Estudio de Nutrición y Riesgo Cardiovascular en España (ENRICA), estudio en el que se empleó el mismo valor de referencia ²⁷⁴. Dichos datos no

resultan muy alentadores, si se tiene en cuenta que la población estudiada es mayoritariamente joven y sana, dónde la prevalencia de dichas alteraciones debería suponerse por debajo de los valores medios de la población nacional.

Cabe mencionar que, estos datos obtenidos mediante el análisis bioquímico muestran una prevalencia de hipercolesterolemia por encima de la declarada por los sujetos mediante el cuestionario de la historia clínica, en dónde como se comentó anteriormente, los resultados mostraron una prevalencia de tan solo 4.29 %. Esto hace pensar que el sesgo por desconocimiento puede llegar a ser muy elevado.

En el caso del colesterol HDL, los valores medios se han situado en 55.09 mg/dl encontrándose como era de esperar, diferencias estadísticamente significativas entre hombres y mujeres. En general, los hombres presentan niveles más reducidos de colesterol HDL en comparación con las mujeres debido a la acción hormonal, donde los estrógenos, predominantes en las mujeres favorecen la elevación de colesterol HDL y triglicéridos, a la vez que descienden los niveles de LDL y VLDL.²⁷⁵ Así, sobre la clasificación de niveles de colesterol HDL, los resultados han mostrado que aproximadamente un tercio de hombres y un 28.60 % de mujeres presentaron valores inferiores a los de referencia. Dichos resultados son similares con los obtenidos en el estudio ENRICA²⁷⁴.

Con respecto a los niveles de colesterol LDL en la población de media han resultado de 126.51 mg/dl, un valor relativamente cercano a 130 mg/dl, que es nivel máximo recomendado en sujetos con dos o más factores de riesgo cardiovascular²⁷⁶. Sin embargo, el porcentaje de población con niveles de colesterol LDL con respecto al límite (menor a 160 mg/dl en sujetos con un solo factor de riesgo cardiovascular), ha resultado más reducido que los datos presentados para el colesterol total²⁷⁶. Así, un 13.00 % del total de la población masculina ha presentado niveles elevados de colesterol LDL, y un 15.40 % en el caso del total de la población femenina. Dicho dato, resulta más alentador que en otros estudios donde se ha obtenido un 45.00 % de población con LDL elevado o con tratamiento farmacológico (ENRICA)²⁷⁴. Sin embargo, hay que tener en cuenta que dicho estudio ha considerado el nivel de referencia de clasificación como mayor a 130 mg/dl, por lo que muy posiblemente, estas cifras sean más cercanas entre estudios, tomando en cuenta dichos límites.

En un intento de optimizar la capacidad predictiva de los valores relativos al perfil lipídico, se han establecido relaciones entre lipoproteínas tales como colesterol total/HDL (índice

aterogénico o de Castelli) y colesterol LDL/HDL que se estiman, son indicadores de riesgo con mayor valor predictivo que los parámetros utilizados de forma independientemente ²⁰⁴.

De acuerdo a estos cocientes se ha determinado el riesgo cardiovascular de la población estudiada. En ambos cocientes, se ha observado una diferencia estadísticamente significativa entre hombres y mujeres como era de esperar, debido a las diferencias de niveles de HDL, resultando en este caso, un mayor porcentaje de riesgo cardiovascular en hombres que en mujeres. Con respecto a la bibliografía, las estadísticas muestran que la población masculina padece con más frecuencia enfermedades cardiovasculares que las mujeres, y por tanto mayor mortalidad por enfermedad cardíaca en hombres que en mujeres, ocurriendo así en prácticamente todos los países desarrollados, tal como se ha observado en este estudio ⁴².

Con respecto a la clasificación en función de los niveles de vitamina D en suero, la mayoría de la población tanto hombres como mujeres, se encuentran en un grado de deficiencia de este micronutriente. Distintos estudios epidemiológicos demuestran la existencia de una deficiencia o insuficiencia de vitamina D en la población de prácticamente todo el mundo ²⁶⁷. Considerando que existen evidencias de que la vitamina D influye en el desarrollo de determinadas enfermedades tales como el cáncer, la enfermedad cardiovascular y relacionadas con procesos autoinmunes, se plantea la necesidad de mejorar dichas carencias ²⁶⁷. Es necesario comentar además, que las necesidades de la población aumentan con la edad, por lo que puede llegar a existir un riesgo de ingesta insuficiente de este micronutriente en edades avanzadas, suponiendo las mismas condiciones.

Aunque factores como la obesidad, la dieta, el color de la piel y la exposición a la luz solar, entre otros, pueden afectar los niveles de vitamina D, para aumentar las cantidades en sangre de esta vitamina, se hace necesario una suficiente exposición al sol, el consumo suficiente de esta vitamina, e incluso puede llegar a ser necesario la suplementación. Si comparamos los niveles de consumo de vitamina D de la población estudiada con sus niveles en sangre, se pueden apreciar resultados similares, por lo que, a parte de la exposición al sol, puede que una carencia de dicha vitamina se vea potenciada por una baja ingesta dietética.

5.1.2 DISCUSIÓN DE LA CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA

La muestra caracterizada según parámetros fenotípicos, también se ha caracterizado en función del genotipo, determinando las características genéticas de la población estudiada relativas a enfermedades relacionadas con la nutrición como la obesidad o enfermedades cardiovasculares, así como al metabolismo lipídico y el proceso inflamatorio.

Las frecuencias que han resultado del análisis se han mostrado en consonancia con las frecuencias obtenidas en el Proyecto HapMap para la población CEU (Residentes de Utah con ancestros del norte y oeste de Europa). La frecuencia alélica y de genotipos tienden a permanecer constantes de una generación a otra y son características de cada región geográfica, si bien es cierto que la migración puede producir cambios importantes en las frecuencias alélicas en un periodo largo de tiempo. El comparar las frecuencias analizadas con las globales de la región estudio y establecer una similitud de frecuencias, indica que el genotipado se ha realizado correctamente evitando así posibles errores de análisis.

Las distribuciones genotípicas de las variantes de algunas variantes, se han desviado del equilibrio de *Hardy-Weinberg* ($p < 0.05$). Según la Ley del equilibrio de poblaciones desarrollada por *Godfrey Hardy* y *Wilhelm Weinberg* alrededor del año 1908, se establece que, en una población suficientemente grande y no sometida a migración, mutación, deriva génica o selección, las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen constantes de generación en generación. Entre las posibles causas que origina un desequilibrio son debidas a que no hay un apareamiento aleatorio, ya sea endogamia (la cual provoca un aumento de genotipos homocigotos), un emparejamiento selectivo, o similar; o bien debido al número finito de población que puede dar lugar a un cambio aleatorio en las frecuencias genotípicas¹⁷³. En el caso de la población estudiada, la mayoría de los polimorfismos se encuentran en equilibrio de *Hardy-Weinberg* por lo que se puede suponer que la población presenta una aleatorización genética correcta, que permite llevar a cabo análisis estadísticos adecuados. Sin embargo, aunque las publicaciones con desvíos en el equilibrio de *Hardy-Weinberg* pueden ser rechazadas por los revisores de revistas científicas, el poder de este test en estudios de asociación genética, se considera limitado²⁷⁷.

En el análisis se ha observado que parejas de polimorfismos pertenecientes a los genes ABCA1, ESR1, FTO, GNB3 y NPY han resultado en desequilibrio de ligamiento. Que los polimorfismos se encuentren en desequilibrio de ligamiento supone que los genes no se segreguen de forma

independiente, y esto genere que determinados polimorfismos se hereden en bloque. Esto suele ocurrir cuando se encuentran a una distancia cercana entre sí involucrando diferentes *loci* en el mismo cromosoma ²⁷⁸. La ventaja que reporta este tipo de desequilibrio es que un número más reducido de variantes genéticas pueden englobar una mayor variedad de variantes de manera que el genotipado de un polimorfismo sea similar a realizar el genotipado de los que se encuentran en desequilibrio de ligamiento al mismo. A su vez, este tipo de herencia puede dar lugar a estudios de haplotipos que identifican de forma más concisa la carga genética para determinada enfermedad, ya que la probabilidad de que dos individuos no relacionados presenten un mismo haplotipo, es escasa.

Del conjunto de los polimorfismos seleccionados, algunos de ellos disponen de cierta evidencia científica para poder desarrollar un posible consejo nutrigenético que puede permitir en el futuro proporcionar recomendaciones nutricionales personalizadas para cada sujeto en función de su componente genético, previniendo y mejorando así las enfermedades crónicas más frecuentes en la población. De hecho, la cantidad de literatura científica relativa a la asociación de variantes genéticas y enfermedades relacionadas con la alimentación, ha aumentado considerablemente en los últimos años. No obstante, cabe resaltar que conforme avance el estado de la ciencia, seguramente se podrán incorporar nuevos conocimientos a los ya encontrados, mediante interacciones entre los mismos, o con nutrientes específicos de la alimentación. Además, para lograr un avance en el conocimiento biomédico, son necesarios una amplia variedad de estudios que corroboren dichas asociaciones. El análisis pormenorizado de estos estudios, así como la unificación de resultados, pueden llegar a resultar de gran utilidad en la práctica clínica y asistencial.

5.2 DISCUSIÓN DE LA ASOCIACIÓN FENOTIPO-GENOTIPO EN LA POBLACIÓN DE LA PLATAFORMA CANTOBLANCO

5.2.1 DISCUSIÓN DE LA ASOCIACIÓN DE LAS VARIANTES GENÉTICAS ESTUDIADAS CON LOS ESTILOS DE VIDA

El gen GCKR, el cual regula la actividad glucosinasa en el hígado, influye sobre la regulación del metabolismo lipídico y la glucosa hepática, de manera que se encuentra fuertemente asociado con niveles de triglicéridos y niveles basales de glucosa en ayunas ²⁷⁹. En concreto, se ha

observado que el alelo minoritario T, perteneciente a la variante rs780094 GCKR se asocia con una serie de rasgos metabólicos dentro de los que se incluyen niveles más elevados de triglicéridos aunque con niveles más adecuados de glucémia ²⁸⁰. Esta implicación en el metabolismo, puede dar pie a pensar en la existencia de una influencia sobre la capacidad de realización de ejercicio físico, sin embargo, no se ha encontrado ninguna publicación que contemple este hecho hasta la fecha ²⁸¹.

Los resultados del presente estudio, no obstante, han mostrado una asociación estadísticamente significativa entre el polimorfismo rs780094 GCKR y las veces que la población realiza actividad física, dónde se ha observado que la mayoría de portadores del genotipo homocigoto común (CC) no realizan a la semana ningún tipo de actividad física, frente a la mayoría de los homocigotos variantes (TT) que realizan al menos algún tipo de actividad física una vez por semana.

Se sabe que el comportamiento sobre la práctica de actividad física está determinado por múltiples factores los cuales juegan un rol determinante sobre los niveles de actividad física realizados. Entre estos factores destaca el sexo y la edad, aunque también influyen otros factores como el nivel socioeconómico, educación, factores psicológicos y la etnia. Sin embargo, también se ha observado tanto en modelos animales como en humanos, que la genética está también asociada a la práctica de actividad física, moderando la influencia sobre los niveles de práctica de la misma. Además, investigaciones sugieren que el rango de práctica de actividad física (inactividad o actividad) quizá esté regulado por varias regiones del genoma ²⁸². Entre los genes asociados a la adherencia y práctica de actividad física se encuentran el receptor de la dopamina 1 (DRD1), así como el hélice-bucle-hélice 2 (NHLH2), también involucrados en el comportamiento alimentario. Además, variantes genéticas del gen MC4R y LEPR también han demostrado estar asociadas a niveles de actividad física en función de su genotipo ²⁸³.

En el caso del gen GCKR, este se encuentra involucrado en la codificación de moléculas implicadas en el metabolismo lipídico y de glucosa, rutas fundamentales en la homeostasis corporal durante la práctica de actividad física.

Por ello puede resultar interesante realizar nuevos estudios más específicos que determinen la capacidad o interés de hacer actividad física con respecto a la presencia de polimorfismos del gen GCKR, ya que quizá puedan aportar una mejor caracterización genética a nivel de rendimiento deportivo, o incluso sobre la implicación del metabolismo de lípidos y glúcidos

sobre el mismo. Así, los resultados de una investigación en la que estudiaron la respuesta de los niveles de triglicéridos mediante una modificación de los estilos de vida (incluida la práctica de actividad física), mostraron que otro polimorfismo del gen GCKR, concretamente los portadores del alelo 446L rs1260326, se asoció con una mayor reducción de niveles de triglicéridos en sangre en comparación con los no portadores. En base a estos resultados y los obtenidos en este trabajo, un futuro estudio podría estar dirigido al estudio de la influencia de la práctica de actividad física en función del genotipo de dicha variante genética para evaluar si los resultados obtenidos son debidos a diferencias con respecto a la práctica de actividad física entre genotipos²⁸⁴.

5.2.2 DISCUSIÓN DE LA ASOCIACIÓN DE LAS VARIANTES GENÉTICAS ESTUDIADAS CON LAS MEDIDAS ANTROPOMÉTRICAS

El índice cintura cadera está relacionado con la predicción de factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares, síndrome metabólico y diabetes ²⁸⁵. Dicha relación puede indicar cierta asociación entre la grasa acumulada a nivel abdominal y dichas patologías que a su vez se encuentran relacionadas entre sí. Por otro lado, el metabolismo del tejido adiposo está regulado de forma compleja mediante múltiples factores de transcripción, entre los cuales se encuentra el receptor activador de la proliferación de peroxisomas γ , el cual juega un papel importante en dicha regulación²⁸⁶. Así, PPAR γ es un regulador esencial del metabolismo de lípidos de manera que participa en la diferenciación de adipocitos, en la regulación de la expresión de la lipoproteína lipasa, la lipasa sensible a hormonas y la leptina. A su vez, también participa en la regulación del metabolismo de la glucosa modulando además la sensibilidad a la insulina ²⁸⁶. Estos comportamientos hacen suponer una relación entre el gen PPAR γ , el metabolismo lipídico, la acumulación de grasa, y el diámetro abdominal.

En los resultados obtenidos, se ha encontrado una asociación estadísticamente significativa entre el índice de la cintura-cadera y el polimorfismo rs3856806 perteneciente al gen PPAR γ . Dichos resultados han mostrado que los portadores del genotipo homocigoto común (CC) presentan menor índice cintura-cadera con respecto a los heterocigotos, y estos a su vez con respecto a los homocigotos variantes.

Varios estudios han relacionado la variante genética estudiada rs3856806 PPAR γ también denominada C1431T o C161T, con el IMC, síndrome metabólico, resistencia a la insulina y

diabetes tipo 2, así como con el metabolismo lipídico y riesgo de aterosclerosis. En concreto, un estudio realizado en mujeres menopáusicas de origen caucásico, mostró que los sujetos obesos con el alelo C1431 presentaron cierta tendencia a alcanzar valores más reducidos para la circunferencia de la cintura ²⁸⁶. Dichos resultados corroboran los resultados obtenidos en el trabajo realizado, donde los portadores del genotipo homocigoto común (CC) presentan menor grado de índice cintura cadera.

Sin embargo, cabe destacar en dicho polimorfismo su efecto con respecto a las diferencias entre etnias. Así, en estudios realizados en diferentes poblaciones, muestran efectos invertidos en función de la presencia de los diferentes alelos, de manera que por ejemplo, en la población asiática, el genotipo desfavorable es el homocigoto común (CC) en lugar del alelo minoritario (T) ²⁸⁷⁻²⁸⁹. De hecho, un meta análisis realizado sobre la asociación entre el receptor activador de la proliferación de peroxisomas γ y la aterosclerosis, muestra que los estudios carecen de evidencia significativa entre la variante rs3856806 y la aterosclerosis, pero sin embargo, si el análisis se realiza por etnias, muestran que la población caucásica portadora del alelo T tiene incrementado de forma significativa el riesgo de aterosclerosis, a diferencia de la población asiática cuyo alelo marcador de riesgo aterosclerótico es el alelo T ²⁹⁰. Aunque hay estudios que relacionan dicha variante con las enfermedades citadas anteriormente, la mayoría se ha llevado a cabo con población asiática, por lo que se hace necesario realizar más estudios similares en población caucásica para poder determinar de forma más precisa el valor diagnóstico de este posible biomarcador.

Se puede predecir, por tanto, que hay un centro de conexión entre la grasa visceral, la regulación metabólica mediante el receptor activador de la proliferación de peroxisomas γ , y enfermedades relacionadas con procesos inflamatorios como la obesidad y las enfermedades cardiovasculares, aunque son necesarios más estudios en la población occidental. Dicha relación quizá pueda predecirse de forma temprana mediante el análisis de la variante rs3856806 PPAR γ siempre y cuando se tenga en cuenta el origen étnico de la población.

5.2.3 DISCUSIÓN DE LA ASOCIACIÓN DE LAS VARIANTES GENÉTICAS ESTUDIADAS CON LOS PARÁMETROS BIOQUÍMICOS

La lipasa hepática es una glicoproteína sintetizada y secretada por el hígado con actividad lipasa, que desempeña un papel importante en el metabolismo de lipoproteínas pro y anti-

aterogénicas. Entre sus funciones se encuentra la hidrólisis de triglicéridos, lipólisis de fosfolípidos, el modelado del LDL y el catabolismo del HDL ²⁹¹.

Entre los polimorfismos localizados en el gen que codifica a esta enzima, destaca la variante rs1800588 LIPC, también conocida como C-480T o -514C/T localizada en la región promotora del gen. Dicha variante interfiere sobre la actividad de esta enzima de manera que se ha observado una reducción significativa de la actividad de la lipasa hepática en los portadores del alelo minoritario (T) de dicha variante, con respecto al genotipo común (CC). A su vez, este mismo alelo se ha asociado en una amplia variedad de estudios con mayores niveles de HDL respecto al genotipo mayoritario ²⁹¹.

Diferentes estudios también han encontrado asociación con los niveles de colesterol total y los genotipos de esta variante, de manera que los portadores del alelo minoritario (T), u homocigotos variantes (TT) presentan mayores niveles de colesterol total frente a los portadores del genotipo común (CC) ^{291,292}. Estos resultados son similares a los encontrados en el análisis del presente estudio, donde los portadores del genotipo homocigoto variante han presentado niveles de colesterol total más elevados que los heterocigotos, y estos que a su vez los homocigotos comunes.

Con respecto a los niveles de colesterol HDL, nuestros resultados también presentan unos niveles más elevados en función del número de alelos minoritarios presentes, de manera que los portadores del genotipo variante (TT) muestran niveles más elevados (β : 2.29, IC95 %: 0.03-4.55).

Por tanto, se puede decir que una menor actividad de esta enzima repercute sobre la concentración de lipoproteínas en sangre, y aunque parece ser desfavorable para los portadores del alelo minoritario en cuanto a los niveles de colesterol total, resulta favorable dado el incremento de los niveles de HDL. Por lo que entonces cabe preguntarse en base a esto que genotipo sería el que más riesgo cardiovascular presentaría, ya que niveles elevados de HDL repercuten sobre niveles totales de colesterol total, pero modifican el cociente LDL/HDL favoreciendo un menor riesgo cardiovascular. Aunque sería necesario realizar más estudios, otros autores predicen que los portadores del genotipo minoritario (TT) presenta menor riesgo cardiovascular como consecuencia de mayores niveles de HDL y a asociaciones previas sobre la retirada de colesterol LDL ²⁹¹. Dichos resultados ponen de manifiesto la importancia de los cocientes aterogénicos para evaluar más adecuadamente el riesgo cardiovascular.

Por otro lado, cabe resaltar que los resultados de nuestro análisis han mostrado que la variante rs1800588 LIPC no está en equilibrio de ligamiento. Aunque este hecho no deja de ser un factor a tener en cuenta, dada correspondencia de resultados con la bibliografía ya publicada, y por no tratarse de un estudio de casos y controles, se ha considerado discutir dichos resultados. A su vez, en otros estudios similares también se han observado ciertos desequilibrios con dicha variante genética ²⁹¹.

Con respecto al gen APOE, clave en el transporte de lípidos, codifica a la apolipoproteína E que participa en la regulación de los niveles de lípidos en plasma y su retirada del torrente sanguíneo. Esto es debido a que esta apolipoproteína está implicada en la interacción de las lipoproteínas con los receptores de la superficie celular en diferentes tejidos y determina el lugar de entrega de los ácidos grasos y el colesterol. A su vez, modula la actividad de la lipoproteína lipasa, enzima que libera ácidos grasos y colesterol de las lipoproteínas, controlando así la velocidad de entrega ²⁹³.

Sin embargo, la actividad biológica de la apoE, constituida por 299 aminoácidos, está determinada por la modificación en su estructura, provocada por los polimorfismos rs429358 y rs7412 que generan una sustitución de los aminoácidos (cisteína o arginina) en las posiciones 112 y 158 ²⁹⁴. Dichas alteraciones dan lugar a tres isoformas: apoE2, apoE3 y apoE4, las cuales suponen una modificación de los niveles de colesterol, predisposición a riesgo de enfermedad cardiovascular y demencia. Además, recientemente se ha visto que esta apolipoproteína puede influir sobre el sistema inmune puesto que se ha relacionado con antígenos lipídicos, asociados a su vez con procesos ateroscleróticos ²⁹⁵.

El análisis realizado en el presente estudio, ha mostrado un incremento de colesterol total y LDL, así como de los cocientes CT/HDL y LDL/HDL, a medida que los genotipos portan mayor número de alelos $\epsilon 4$ y disminuyen los $\epsilon 2$. Así, en presencia del alelo $\epsilon 2$, ha resultado una disminución estadísticamente significativa de dichos parámetros lipídicos, en comparación con el alelo $\epsilon 3$. En el caso del alelo $\epsilon 4$, sin embargo, aunque no se han generado aumentos significativos con respecto a los portadores del alelo $\epsilon 3$, en el caso del genotipo $\epsilon 4\epsilon 4$ con respecto al LDL y CT/HDL, sí que se han observado aumentos estadísticamente significaditos en comparación con el genotipo $\epsilon 3\epsilon 3$.

Dichos resultados se muestran en consonancia con la bibliografía publicada dónde igualmente se aprecia que los portadores de la isoforma ApoE2 presentaron niveles más reducidos de colesterol total y LDL con respecto al resto de isoformas ^{35,225,296}. Y en el caso de la isoforma

ApoE4, niveles más elevados de colesterol total y LDL en comparación con los portadores del alelo $\epsilon 3$ ^{35,225,293,295–297}.

Estos resultados podrían explicarse ya que la isoforma apoE2, presenta una baja afinidad por el receptor LDL, lo que provoca una menor retirada de apoE y mayores concentraciones en plasma. En respuesta a este proceso, el hígado aumenta la afinidad por el LDL lo que provoca niveles reducidos de colesterol. De forma contraria, la isoforma apoE4, presenta mayor afinidad existiendo niveles menores de apoE en plasma y por tanto mayores de cantidades de colesterol ²⁹⁵.

La razón por la que el alelo $\epsilon 4$ no ha presentado resultados significativos con respecto al $\epsilon 3$, podría deberse al tamaño muestral para los portadores del genotipo $\epsilon 4\epsilon 4$, que, dada su frecuencia poblacional, ha resultado reducido. Igualmente hay que tener en cuenta la frecuencia muestral en el caso de genotipo $\epsilon 2\epsilon 2$, donde la frecuencia es incluso mucho menor. Por ello, no se ha tenido en cuenta el efecto significativo para este último genotipo.

A su vez, los resultados mostraron un incremento más marcado del cociente LDL/HDL en los portadores del alelo $\epsilon 4$ en comparación con el cociente CT/HDL, que podría explicarse por la presencia de niveles más bajos de HDL en los portadores de este alelo, hipótesis que concuerda con otros estudios donde reportaron que los portadores del alelo $\epsilon 4$ presentaron concentraciones estadísticamente significativas menores que los portadores de $\epsilon 2$ ^{298,299}.

Los resultados obtenidos en este estudio, en consonancia con la bibliografía publicada, dan pie a considerar la incorporación de dichos marcadores genéticos al diagnóstico clínico, considerándose un marcador útil de riesgo cardiovascular. De hecho, su determinación en etapas iniciales de la vida, en la que el riesgo cardiovascular resulta presintomático, puede considerarse valioso a la hora de prevenir enfermedades. Los resultados obtenidos en niños muestran características similares que en los realizados en adultos^{293,296}.

En el caso de la variante rs328 perteneciente al gen que codifica la lipoproteína lipasa (LPL), se ha observado una asociación con respecto a la clasificación de triglicéridos en sangre, de manera que un mayor número de portadores del genotipo heterocigoto + homocigoto variante han presentado niveles de triglicéridos normales, a diferencia de los homocigotos comunes. Dichos resultados concuerdan con los resultados obtenidos en otros estudios publicados. Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran por tanto que la

cantidad de alelos minoritarios aporta un menor riesgo de tener niveles de triglicéridos elevados.³⁰⁰⁻³⁰²

La lipoproteína lipasa, es una enzima involucrada en el metabolismo de los lípidos mediante la hidrólisis de partículas ricas en triglicéridos en el músculo, el tejido adiposo y macrófagos, generando ácidos grasos libres y glicerol para su utilización y almacenamiento de la energía³⁰¹. Cuando esta enzima no funciona correctamente, la hidrólisis de los triglicéridos plasmáticos se ve gravemente comprometida, lo que lleva a la acumulación de niveles elevados de triglicéridos en plasma³⁰². Por tanto, el gen que codifica para esta proteína, es candidato como biomarcador de la enfermedad coronaria³⁰¹.

El polimorfismo analizado, rs328 LPL, comúnmente denominado S447X, provoca un acortamiento de dos aminoácidos en la estructura de la proteína, generado por el alelo X (de parada) el cual se presenta en aproximadamente el 10 % de la población. Dicha variación, resulta interesante ya que al igual que muestran nuestros resultados, se ha observado que provoca entre un 10 - 25 % menos de niveles de triglicéridos en plasma y reduce por tanto la susceptibilidad a la enfermedad coronaria.

Aunque el mecanismo por el cual este polimorfismo afecta el metabolismo de los triglicéridos aún no está del todo claro³⁰², los portadores del alelo 447X presentan perfiles lipídicos modestamente más ventajosos. Según la literatura, esta variante también se ha asociado con mayores niveles de HDL lo que indica un factor de protección cardiovascular añadido y que posible existencia interrelaciones entre las vías metabólicas del HDL y de los triglicéridos³⁰¹⁻³⁰³.

Una vez sabido que los portadores de la variante genética 447X presentan menores niveles de triglicéridos y mayores de HDL, los futuros estudios se pueden encaminar a asociar dicho polimorfismo con determinados grupos de nutrientes, de manera que se pueda establecer una interacción gen-dieta y así, mejorar el perfil lipídico en los portadores del genotipo común de dicha variante. Entre los estudios llevados a cabo se ha encontrado una interacción de esta variante con el IMC, y los niveles de triglicéridos y HDL, así como con el consumo de diferentes tipos de grasas, alcohol, entre otros^{304,305}. Sin embargo, hay pocos estudios realizados en población europea.

Por último, con respecto a la clasificación de niveles de vitamina D en sangre se ha observado una asociación con el polimorfismo rs767455 TNFRSF1 α , de manera que la mayor parte de los portadores del genotipo homocigoto común, han presentado niveles insuficientes de vitamina

D en sangre. Así este nivel de insuficiencia va mejorando a medida que aumentan el número de copias del alelo minoritario.

Aunque no se ha encontrado bibliografía que relacione expresamente el polimorfismo rs767455 TNFRSF1 α con los niveles de vitamina D en sangre, en términos biológicos, la literatura indica que es probable que la vitamina D influya directamente en la respuesta inmunológica regulando la expresión de genes como el TNFRSF1A. Estudios relacionan como el factor de necrosis tumoral miembro 1A se encuentra relacionado con enfermedades autoinmunes y concretamente con recaídas en esclerosis múltiple, donde se ha asociado a la exposición de sol y vitamina D ^{306,307}.

Sin embargo, no se sabe si el estado proinflamatorio está relacionado con los parámetros óseos, aunque la enfermedad ósea se ha llegado a asociar a un proceso proinflamatorio ³⁰⁸.

La asociación entre el receptor del factor de necrosis tumoral con la inflamación y los niveles de vitamina D no está suficientemente documentada, sin embargo indirectamente, los resultados de determinados estudios han sugerido una posible relación ³⁰⁸. Por ello, nuevos estudios sobre la relación entre el receptor del factor de necrosis tumoral y los niveles de vitamina D en sangre, pueden ayudar al conocimiento de una posible relación entre la vitamina D y los procesos inflamatorios o autoinmunes.

A su vez, cabe resaltar la asociación obtenida en este estudio sobre la ingesta de vitamina D. Uniendo los resultados, se observa que la mayoría de la población estudiada presenta el genotipo homocigoto común del rs767455 TNFRSF1 α ; los portadores de dicho genotipo presentan menores niveles de vitamina D en sangre y a su vez, con una ingesta insuficiente en la mayoría de la población. Por ello, la realización de estudios que busquen asociación entre la ingesta de vitamina D y factores genéticos en los que se incluya el rs767455 TNFRSF1 α también puede resultar interesante, con el objetivo de poder asegurar una ingesta de esta vitamina en la población candidata a ser deficiente.

5.2.4 DISCUSIÓN DE LA INTERACCIÓN DE LAS VARIANTES GENÉTICAS ESTUDIADAS CON NUTRIENTES Y ALIMENTOS CONSUMIDOS

El análisis de interacción de las variables genéticas en función de los nutrientes y la alimentación, se ha llevado a cabo en base al estudio bibliográfico de interacciones previas de

polimorfismos de un solo nucleótido con los datos fenotípicos recogidos. Sin embargo, las interacciones gen-dieta encontradas en la bibliografía se observaron principalmente en estudios de intervención, a diferencia de este estudio, caracterizado por ser descriptivo. De todas las variables analizadas presentadas en la tabla 3.13, finalmente se encontró una asociación del polimorfismo rs3749474 CLOCK con el índice cintura-cadera en función del grado de apetito presentado.

Es sabido que los biorritmos están modulados por la expresión de genes CLOCK y ayudan a una sincronización adecuada del reloj circadiano endógeno, lo que permite predecir y anticipar cambios ambientales diarios y en el tiempo y como consecuencia, permiten ajustar las funciones fisiológicas y de comportamiento ³⁰⁹. También es sabido que aspectos cronobiológicos asociados a estos “genes reloj” influyen sobre enfermedades tales como la obesidad y el síndrome metabólico. Se sabe que los relojes circadianos influyen sobre la regulación de la homeostasis de lípidos y glúcidos así como sobre el tejido adiposo y el contenido de grasa abdominal ³¹⁰. Concretamente la variante rs3749474 CLOCK, que genera un cambio en la estructura del ARN mensajero de manera que se reduce el nivel de expresión, se ha asociado a una mayor ingesta así como mayor ingesta de grasas presentando más obesidad abdominal en los sujetos portadores de la variante ^{180,311}.

El equilibrio energético, al igual que el consumo de alimentos, la termogénesis y el metabolismo de glúcidos y lípidos, están sujetos a la regulación de los ritmos circadianos que sincroniza la ingesta y el gasto de energía. A su vez, se ha visto que los genes CLOCK influyen en la regulación de la expresión de adipocitoquinas como la adiponectina, la resistina y la leptina que varían a lo largo del ciclo de 24 horas ³¹². Por otro lado, la alteración de los ritmos circadianos que conllevan a una reducción de horas de sueño, se ha asociado de forma significativa a la ganancia de peso, obesidad y mayor diámetro de la cintura ³¹³. Así, se ha observado que alteraciones en el ritmo circadiano provocados por la disminución de las horas de sueño, provocaron una disminución del 18 % de los niveles de leptina (hormona anorexigénica) y un aumento del 24 % de la grelina (hormona orexigénica) lo que provocó un aumento de hambre el 24 % y apetito un 23 %. Por lo que los individuos consumen un mayor número de calorías debido a un aumento del hambre y a una disminución de la saciedad. Además del aumento de ingesta energética, también se ha observado una preferencia a comer alimentos menos saludables, alimentos más calóricos y con mayor índice glucémico, siendo la respuesta a estímulos alimentarios mayor al ver alimentos poco saludables en los privados de sueño ³¹⁴.

Por tanto, es factible suponer que los cambios hormonales provocados por la regulación de los genes circadianos, influyen sobre el metabolismo del tejido adiposo y provocan un aumento de apetito, lo que conduce no solo a un aumento de peso, sino a la gestación del síndrome metabólico.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que los portadores de la variante rs3749474 CLOCK, aumentan en 15 unidades el índice cintura-cadera con respecto a los homocigotos comunes (CC) que aumentan unas 3 unidades. De esta manera, la presencia del alelo minoritario (T) indica una posición desfavorable frente al aumento de apetito y por tanto los sujetos portadores de esta variante, se pueden ver beneficiados mediante pautas para aumentar la saciedad y horas de sueño.

Los resultados del presente estudio, ponen de manifiesto lo que ya hay publicado, es decir una relación entre la variante rs3749474 CLOCK, la ingesta energética y de grasas; pero a su vez, también sobre un mayor aumento del índice cintura-cadera en los portadores de dicha variante. Por lo que no solo ingieren más energía y alimentos grasos, sino que ese consumo además puede provocar una mayor acumulación de grasa a nivel abdominal, fenómeno que alimenta una innumerable cantidad de procesos metabólicos asociados con la inflamación y enfermedades crónicas.

Así, aunque varias publicaciones muestran estudios sobre esta variante y su asociación con la ingesta energética, consumo de grasas y tejido adiposo y obesidad abdominal, hasta ahora no se ha encontrado bibliografía sobre la interacción del genotipo variante del polimorfismo rs3749474 CLOCK, con el índice cintura-cadera en función del grado de apetito^{180,311}. Por ello, resulta interesante realizar más estudios que avalen dichos resultados con el objetivo de aumentar el conocimiento sobre la influencia de dicho gen sobre el metabolismo, y poder ofrecer unas pautas específicas a la población en función de su genotipo.

El estudio de las interacciones entre la dieta, la genética y la enfermedad posee una gran complejidad en el caso en el que se estudien enfermedades en las que intervienen múltiples factores. Por ello, resulta complejo determinar que nutriente puede resultar más adecuado para un individuo, sin conocer con exactitud todas las variantes genéticas así como el efecto que provocan estas sobre el consumo de nutrientes ³⁵.

5.3 DISCUSIÓN DE LAS INTERACCIONES GEN-DIETA ENTRE MARCADORES GENÉTICOS Y DETERMINADOS COMPONENTES DE LOS ALIMENTOS MEDIANTE ENSAYOS NURIGENETICOS DE INTERVENCIÓN

5.3.1 “IDENTIFICACIÓN DE SNPs IMPLICADOS EN LA DIFERENTE RESPUESTA A UNA LECHE ENRIQUECIDA CON ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3, Y EL PERFIL LIPIDICO DE LA LECHE”

5.3.1.1 *Discusión de la diferente respuesta sobre la reducción de riesgo cardiovascular mediada por el consumo de leche enriquecida en omega-3, en función de las distintas variantes genéticas*

Determinar si la población, dependiendo de su perfil genético, puede beneficiarse más de un tipo de leche que de otra, resulta interesante de cara a la prevención de la enfermedad cardiovascular, tan frecuente en la población actualmente. Por ello, se han analizado los efectos de dos tipos de leche (enriquecida con ácidos grasos omega-3 y leche semidesnatada) sobre algunos biomarcadores de riesgo cardiovascular, en función del genotipo para una serie de polimorfismos implicados en el metabolismo de ácidos grasos.

Los resultados han mostrado que los niveles de colesterol total, de colesterol LDL, cociente CT/HDL y LDL/HDL, disminuyeron significativamente después del consumo de leche enriquecida y por el contrario, aumentaron, después de la ingesta de leche semidesnatada. Al mismo tiempo, los niveles de colesterol HDL se elevaron significativamente después del consumo de leche enriquecida, pero no se produjeron cambios tras el consumo de leche semidesnatada. Estos resultados muestran *a priori*, que el consumo de leche enriquecida presenta mayor beneficio frente al consumo de leche no enriquecida sobre los biomarcadores de riesgo cardiovascular ²³⁷.

No obstante, los últimos resultados bibliográficos publicados, que muestran los efectos de los ácidos grasos poliinsaturados omega 3 sobre el riesgo de enfermedad cardiovascular, aunque revelan un aumento de colesterol HDL igual que en este estudio, sin embargo muestran también un aumento de colesterol LDL ^{315,316}. Curiosamente, estudios anteriores al año 2010, muestran bajadas de niveles de colesterol LDL entre un 6 – 20 % tras el consumo de lácteos enriquecidos con ácidos grasos poliinsaturados, especialmente cuando los valores basales se encontraban elevados ³¹⁷. Este hecho indica la existencia de resultados controvertidos acerca de los efectos de los ácidos grasos omega 3 sobre los niveles de colesterol LDL. Una posible razón quizá puede deberse a la matriz en la que se suplementan dichos ácidos grasos. En los

estudios realizados con leches enriquecidas, los niveles de colesterol LDL se reducen o se mantienen después de su consumo, sin embargo, en los estudios donde dichos ácidos grasos se proporcionan como suplementos, o en dosis más elevadas, los niveles de colesterol LDL presentan un aumento ^{316,317}.

Con respecto al colesterol total, los resultados obtenidos en este estudio, se asemejan a los estudios anteriormente realizados, que muestran una reducción de los niveles entre un 4 % y un 11 % tras el consumo de lácteos enriquecidos con ácidos grasos poliinsaturados, especialmente cuando los valores basales se encontraban elevados ³¹⁷.

Los estudios sobre el consumo de ácidos grasos poliinsaturados también muestran una reducción de los niveles de triglicéridos después del tratamiento. A diferencia de los parámetros anteriores, con respecto a los triglicéridos parece existir mayor unanimidad con respecto a los resultados obtenidos ^{316,317}. En este estudio, se ha producido también una bajada de triglicéridos en los consumidores de leche enriquecida y una subida en el caso de los consumidores de leche semidesnatada, sin embargo, dicho cambio no ha llegado a resultar significativo. Este resultado puede ser debido a que en este caso se ha estudiado el efecto en comparación con el consumo de leche semidesnatada, ya que los resultados obtenidos de únicamente la leche enriquecida, muestran una disminución significativa de los niveles de triglicéridos en el tiempo ²³⁷.

En general, analizando la bibliografía publicada así como los resultados obtenidos en este estudio, el consumo de leche enriquecida en ácidos grasos omega-3 presenta un beneficio sobre la prevención de enfermedades cardiovasculares, con la ventaja de hacerlo sin modificar los patrones alimentarios de la población, ya que permite continuar consumiendo un alimento muy incorporado y aceptado en la dieta ³¹⁷. Por otro lado, en los últimos años, los estudios sobre el efecto del consumo de omega 3 presentan resultados no concluyentes y se plantea el tipo de recomendación que se debe dar. Sin embargo, que dichos resultados no hayan resultado concluyentes no significa que los ácidos grasos omega 3 sean inefectivos de forma general, sino que puede que no se haya mostrado su efectividad en el contexto adecuado ³¹⁸. Entre las razones por lo que se han producido resultados no concluyentes se encuentra el corto periodo de tratamiento, las dosis diarias ingeridas de omega 3 y los reducidos tamaños muestrales de algunos estudios. A su vez, otra de las razones a la que puede deberse, es la diferente respuesta provocada por la variabilidad genética entre individuos, que supone una limitación en el enfoque tradicional sobre la evaluación de los efectos sobre el riesgo de

enfermedad cardiovascular. Quizá por esto, en los últimos años ha ido en aumento el número de investigaciones que engloban el factor genético como causa probable de provocar diferentes efectos sobre la población, pese a someterse al mismo tratamiento ³¹⁹.

Por esta razón, a pesar de que el consumo de leche enriquecida con omega 3 haya resultado beneficiosa para la población general, se ha querido estudiar si las diferencias existentes en el perfil genético influyen sobre los efectos provocados por el consumo de leche enriquecida en omega 3, y si determinada población puede llegar a beneficiarse más de dicho consumo.

Varios estudios han mostrado que la capacidad de respuesta del organismo en función de los cambios en la ingesta dietética, pueden explicarse en parte por la variación genética interindividual ³¹⁹.

En el presente estudio, se ha observado que los polimorfismos rs135551 PPAR α y rs2205895 SELP, modulan la magnitud de los efectos del consumo de leche enriquecida y semidesnatada sobre el biomarcador de riesgo aterogénico (CT/HDL). Los homocigotos comunes de estas variantes genéticas, presentan un riesgo aterogénico significativamente menor en el grupo de consumo de leche enriquecida en comparación con el grupo de leche semidesnatada. De esta manera, los homocigotos del alelo C de la variante rs135551 PPAR α y los homocigotos del alelo G de la variante rs2205895 SELP, han sido los que se han beneficiado del consumo de leche enriquecida.

Con respecto al polimorfismo rs135551 PPAR α , la bibliografía publicada es limitada actualmente. Sin embargo, se ha observado que la presencia del alelo minoritario (CT y TT) de rs135551 PPAR α puede influir en el riesgo de infarto de miocardio en la población europea ³²⁰. La presencia de este alelo minoritario en el presente estudio no ha presentado diferencias significativas *post-hoc* en función del tratamiento y los marcadores de riesgo cardiovascular, por lo que puede que el consumo de grasa láctea no influya de forma especial sobre los portadores del alelo minoritario para esta variante.

Sin embargo, en el caso del alelo mayoritario, es decir los portadores del genotipo homocigoto común (CC) del rs135551, sí que muestran diferencias significativas sobre los cocientes indicadores de riesgo aterogénico de acuerdo con el tipo de leche que se consume, modulando así la magnitud de los efectos del consumo de leche enriquecida y semidesnatada sobre el biomarcador de riesgo aterogénico (CT/HDL). Así, los consumidores de leche enriquecida portadores del genotipo homocigoto común (CC), han reducido de forma significativa el

cociente CT/HDL, frente a los consumidores de leche semidesnatada, que no solo no lo han disminuido, sino que lo han aumentado.

El desequilibrio de ligamiento de la secuencia cercana al polimorfismo estudiado rs135551, ha mostrado una correlación con las variantes rs135539, y rs135543 del mismo gen, considerándose un haplo-bloque ³²⁰. También se ha visto que concretamente la variante rs135539 está relacionada con la variante rs1800206 (Leu162Val) ^{321,322}. Los resultados publicados sobre estas variantes indican una asociación entre la variante rs135539 y rs1800206, así como con niveles reducidos de colesterol total ³²³.

Una de las variantes más estudiadas de PPAR α es el rs1800206 (Leu162Val) cuyos genotipos se han asociado a una diferente respuesta sobre los niveles de lipoproteínas, en función del tipo de grasa consumida ^{324,325}. Así, los portadores del alelo V162, después de consumir una dieta con cociente de ácidos grasos poliinsaturados y saturados de 1:1, mostraron menores concentraciones de lipoproteínas en sangre con respecto a los homocigotos L162 ³²⁶. Esto sugiere que variantes de PPARA pueden modular el riesgo cardiovascular, influyendo sobre el perfil lipídico en función de la dieta.

En el presente estudio, los portadores del genotipo homocigoto común (CC) del rs135551, muestran diferencias significativas sobre los cocientes indicadores de riesgo aterogénico de acuerdo con el tipo de leche que se consume, modulando así la magnitud de los efectos del consumo de leche enriquecida y semidesnatada sobre el biomarcador de riesgo aterogénico (CT/HDL). De esta manera, los portadores del genotipo homocigoto parecen particularmente beneficiados de la ingesta de leche enriquecida en comparación con los consumidores de leche semidesnatada ya que los portadores de este mismo genotipo, tienen un mayor riesgo cardiovascular (en relación a los cocientes CT/HDL y LDL/HDL) tras el consumo de leche semidesnatada.

Por lo tanto, la determinación del genotipo rs135551 PPAR α puede ser útil en la identificación de las personas que tienen más probabilidades de beneficiarse de consumo de leche enriquecida basándose en la prevención de las enfermedades cardiovasculares.

Con respecto al polimorfismo rs2205895 SELP, existe muy poca bibliografía publicada, la cual se encuentra relacionada con el accidente cerebrovascular isquémico ³²⁷. A su vez, dicho polimorfismo se ha asociado con trombosis venosa relacionada con el embarazo en un estudio donde se seleccionaron genes relativos a hormonas cuyos niveles cambian en dicho proceso

fisiológico ³²⁸. Por otro lado, cabe señalar que no se han encontrado estudios de intervención nutricional sobre este polimorfismo y la respuesta a la dieta.

El gen SELP codifica a una molécula de adhesión implicada en mecanismos inflamatorios, así como en la coagulación sanguínea, contribuyendo a la formación de trombos y aterosclerosis. Estudios sobre polimorfismos de SELP han establecido una asociación con el riesgo de aterosclerosis ^{329–331}.

Los resultados del estudio de intervención llevado a cabo, van más allá y muestran que en función del tipo de grasa láctea consumida, existe una diferente respuesta sobre marcadores de riesgo cardiovascular, dependiendo del genotipo presentado para el polimorfismo rs2205895 SELP.

De esta manera, los portadores del genotipo homocigoto común (GG) de esta variante, muestran diferencias significativas sobre el riesgo aterogénico de acuerdo al tipo de leche consumida, modulando así la magnitud de los efectos del consumo de leche enriquecida y semidesnatada sobre el biomarcador de riesgo cardiovascular (CT/HDL). Así, los consumidores de leche enriquecida portadores del genotipo homocigoto común (GG), han reducido de forma significativa el cociente CT/HDL, frente a los consumidores de leche semidesnatada que al igual que en el caso anterior, lo han aumentado.

Aunque no se han encontrado publicaciones sobre la asociación significativa de la variante rs2205895 SELP y niveles de apolipoproteínas en sangre, el análisis de desequilibrio de ligamiento muestra correlación de este polimorfismo con las variantes rs6133 y rs6136 del mismo gen. Estos polimorfismos han sido más estudiados y, en concreto varios estudios indican que la variante rs6136, también conocida como Thr715Pro, presenta una asociación con la patogénesis de la enfermedad coronaria e infarto de miocardio ^{332,333}. A su vez, los estudios sobre esta variante, muestran su asociación con los niveles de selectina P soluble, considerado como un biomarcador de riesgo de aterosclerosis y de inflamación ^{330,334,335}. Esto puede dar pie a pensar que, el polimorfismo rs2205895 SELP en equilibrio de ligamiento con el rs6136, quizá influya sobre los niveles de selectina P en sangre y, por tanto, pueda ser considerado un biomarcador de inflamación y riesgo aterogénico, además de predecir una respuesta en función del tipo de dieta.

Por otro lado, un estudio de intervención nutricional en el que se analizó la influencia del consumo de ácidos grasos omega 3, sobre las moléculas de adhesión en suero, mostró una

disminución significativa de los niveles de selectina P, más marcado en el sexo masculino ³³⁶. Sin embargo, otro estudio en cual se evaluó la influencia del consumo de omega 3 sobre índices de inflamación y trombogénesis, donde se incluía la activación plaquetaria de la selectina P soluble, encontraron una disminución significativa de los niveles de colesterol total, LDL colesterol y cociente CT/HDL colesterol, pero no una asociación sobre la mejora de los niveles de función endotelial, reactividad plaquetaria e inflamación ³³⁷. Los resultados contradictorios sobre los niveles de selectina P en suero después de la ingesta de ácidos grasos pueden ser debidos a la cantidad suministrada ya que en el primer estudio se observó asociación con un consumo de 6.6 g, y en el segundo estudio con un consumo de 1 g/día. El efecto por tanto, puede depender de las dosis y el género ³³⁶.

En el presente estudio, no se evaluaron los niveles de selectina P en sangre, por lo que no se pudo determinar si el consumo de leche enriquecida en omega 3 se asocia a menores niveles de selectina P, en base a los diferentes genotipos. Sin embargo, en los estudios de intervención anteriormente realizados no se analizaron las variables en función de la genética por lo que no se sabe si los resultados también están determinados por condicionantes genéticos.

Por tanto, la realización de más estudios que analicen la interacción entre el consumo de grasas omega 3 sobre marcadores de riesgo cardiovascular, incluyendo marcadores de inflamación como selectina P, en función de polimorfismos genéticos relacionados a dichos marcadores, puede contribuir a establecer un biomarcador genético de riesgo cardiovascular que condiciona la respuesta del organismo a diferentes componentes de la alimentación.

No obstante, la determinación del genotipo rs2205895 SELP puede ser útil en la identificación de las personas que tienen más probabilidades de beneficiarse de consumo de leche enriquecida para la prevención de las enfermedades cardiovasculares y puede presentar un interés científico, mediante el avance en la comprensión del papel que juegan los polimorfismos genéticos en la modulación de las respuestas del perfil lipídico de acuerdo con el tipo de la ingesta de leche que se consume. Así, se podría explicar en parte, la variación en las respuestas individuales a los diferentes tipos de leches.

5.3.1.2 Discusión de la diferente respuesta al consumo de grasa de leche y su efecto en la disminución de riesgo cardiovascular según los distintos perfiles genéticos

Este estudio ha analizado los efectos de la ingesta de leche desnatada y semidesnatada sobre algunos de los biomarcadores de riesgo cardiovascular, en función del genotipo para una serie de polimorfismos implicados en el metabolismo lipídico y relacionados con procesos inflamatorios, en individuos con riesgo cardiovascular moderado.

Los resultados han mostrado que el tipo de leche consumida, semidesnatada o desnatada, no ha afectado de forma significativa al perfil lipídico aterogénico de los sujetos estudios en su conjunto, al igual que se ha observado en estudios previos ^{338,339}. Sin embargo, en el estudio analizado en función de los genotipos, el consumo de leche desnatada ha mostrado diferentes efectos en función del genotipo de cada sujeto.

Está bien documentada la contribución que posee la leche a la hora de cubrir los requerimientos dietéticos diarios de energía, proteínas de alto valor biológico, así como de vitaminas y minerales esenciales. Sin embargo, la importancia nutricional de la grasa láctea no ha estado tan clara.

Existe una percepción general de que los alimentos que contienen grasas saturadas puedan tener beneficios para la salud ³⁴⁰, sin embargo, existen controversias sobre la relación entre los productos lácteos, y particularmente la leche, y el riesgo cardiovascular ^{341,342}.

Un meta-análisis reciente sobre dosis-respuesta realizado en base a estudios prospectivos, analizó la relación entre la ingesta total de productos lácteos, de leche y la baja o alta ingesta de grasa láctea, con el riesgo de enfermedades cardiovasculares y todas las causas de mortalidad. Los resultados mostraron que el consumo de leche podría estar inversamente asociado con el riesgo cardiovascular ³⁴³.

La literatura, sin embargo, dispone de pocos estudios de intervención nutricional, y estos han sido desarrollados con el objetivo de estudiar los efectos entre los diferentes tipos de productos lácteos solamente (mantequilla, queso, yogur, leche, etc.) sobre cambios en los niveles de lípidos plasmáticos. Los resultados sobre estos estudios sugieren que en función de los diferentes productos lácteos, estos provocan diferentes efectos sobre las lipoproteínas, y que los efectos reales causados por el consumo de cantidades razonables de productos lácteos sobre el riesgo cardiovascular, no están claros ⁹⁰.

La falta de acuerdo en relación sobre el efecto del consumo de leche y el riesgo de enfermedad cardiovascular, junto con las percepciones negativas con respecto a la cantidad de ácidos grasos saturados en la leche, han dado lugar a una reducción general en el consumo de leche acompañado por la elección sistemática de productos lácteos reducidos en grasa. Sin embargo, esto podría tener un efecto sobre el consumo total de calorías, especialmente en las personas mayores o personas desnutridas, lo que podría afectar negativamente a su estado nutricional ³⁴⁴. Por otro lado, cabe destacar que la grasa aporta una mayor palatabilidad a la leche, de manera que las personas que consumen leche desnatada pueden disfrutar de la leche en menos medida.

En el presente estudio, no se han observado diferencias significativas de las variables medidas entre el grupo consumidor de leche semidesnatada y desnatada a lo largo de 12 meses, lo que sugiere que el tipo de leche no tiene ningún efecto sobre los biomarcadores seleccionados de riesgo cardiovascular. Puede ser que las diferencias en la composición de ambas leches consumidas (apenas 5.64 g de grasa saturada y 50.4 kcal/día), hayan resultado insuficientes para reflejar diferencias significativas en la respuesta a su consumo. Sin embargo, la etiología de las enfermedades cardiovasculares (que es compleja y multifactorial) y la eficacia de cualquier tratamiento, requiere llevar a cabo un análisis genético para determinar los efectos a nivel individual y no a nivel poblacional ^{345,346}. De hecho, hay una creciente evidencia de que a pesar de que las recomendaciones nutricionales genéricas pueden ser apropiadas para la población general, la variabilidad entre individuos (debido a una combinación de factores ambientales y genéticos) puede hacerlos menos apropiados a nivel individual. La interacción entre las propiedades genéticas y la dieta ha ayudado a comprender esta variabilidad ³⁴⁷. Con un mayor estudio sobre la interacción entre los marcadores genéticos (SNPs) y la dieta, puede llegar a ser posible entender las variaciones interindividuales en el metabolismo lipídico. Y esto podría conducir a un uso de recomendaciones nutricionales personalizadas para combatir los trastornos metabólicos ³⁴⁷.

Varios estudios han mostrado que la heterogeneidad en las lipoproteínas plasmáticas y la capacidad de respuesta del metabolismo lipídico a los cambios de la ingesta de grasa en la dieta, puede explicarse en parte por la variación en los genes que codifican para enzimas o proteínas relacionadas con el metabolismo de lipoproteínas ^{348,349}.

Los receptores activadores de la proliferación de peroxisomas (PPAR) constituyen uno de los reguladores centrales entre las interacciones gen-dieta con respecto a la ingesta de grasas.

PPARA es un factor de transcripción dependiente de ligando que juega un papel clave en la homeostasis de los lípidos. De hecho, la activación de PPARA contribuye a la disminución de las lipoproteínas ricas en triglicéridos, mejora las concentraciones de HDL colesterol, y a la reducción de la oxidación del LDL colesterol, influyen en la actividad de los factores clave en el metabolismo lipídico tales como la lipoproteína lipasa, la apolipoproteína C-III, y la inducción de enzimas relacionadas con la oxidación de ácidos grasos ³⁵⁰.

El análisis de variantes genéticas específicas de este gen, ha demostrado que influyen en las concentraciones de lípidos durante el ayuno, así como la respuesta postprandial aguda a la grasa de la dieta ³⁴⁷.

En este estudio, se ha observado que el polimorfismo PPARA rs135549 modula la magnitud de los efectos del consumo de leche semidesnatada y desnatada sobre los biomarcadores de riesgo cardiovascular. Los individuos homocigotos para el alelo mayoritario T, han mostrado una reducción en el cociente TC/HDL y LDL/HDL después de consumir leche desnatada, y un aumento después de consumir leche semidesnatada en comparación con los portadores del alelo minoritario C. Por lo tanto, los homocigotos con el alelo T parecen beneficiarse de la ingesta de leche desnatada, pero están en desventaja después de consumir leche semidesnatada en comparación con los portadores del alelo C, o incluso de la población en general.

Como se ha visto en el apartado anterior, una de las variantes más estudiadas de PPAR α es el rs1800206 (Leu162Val). En esta variante, el alelo minoritario se ha asociado con mayores concentraciones en ayudas de colesterol total, LDL colesterol, y apoB después de una dieta rica en grasa saturada (63% ácidos grasos saturados, 33% de monoinsaturados y 4% de poliinsaturados) ³²⁵. Esto sugiere que las variantes PPARA Leu162Val y la PPARA rs135549, pueden modular el riesgo cardiovascular, influyendo en las concentraciones de lípidos en sangre. Sin embargo, esto debe llevarse a cabo a través de diferentes mecanismos, ya que PPARA rs135549 se encuentra localizado en un intrón, mientras que la variante PPAR Leu162Val es una variante de cambio de sentido (*missense*).

Antes de la corrección de *Bonferroni*, se muestran otros polimorfismos que se asocian con cambios en el cociente TC/HDL y LDL/HDL y el tipo de leche que se consume: PPARA rs135551; SELE rs5368; SR nEBF2 rs2229442 y SELP rs6131.

Después de la corrección de *Bonferroni* sin embargo, sólo la variante PPARA rs135549 ha seguido estando significativamente asociada con la respuesta de ambas relaciones. La falta de un efecto significativo sobre las otras variantes genéticas analizadas, podría estar relacionado con el hecho de que se trataba de un análisis simultáneo de diferentes SNPs en una población relativamente pequeña. Por ello, para aclarar mejor el efecto que ejercer de cada variante genética se deben realizar más estudios adicionales con muestras de mayor tamaño o centrados en determinados genotipos.

A pesar de la heterogénea capacidad de respuesta de los lípidos en suero en función a la ingesta de grasa dietética, previamente asociada con variantes genéticas, Estévez-González *et al.* (2010) fueron los primeros en examinar el cambio en los lípidos séricos después del consumo de diferentes tipos de leche, y los primeros en investigar la modulación de las concentraciones de lípidos plasmáticos asociados con el polimorfismo Taq-1B en el gen de la proteína de transferencia del éster del colesterol (CEPT). Los autores identificaron aumentos en el HDL colesterol (reduciendo la relación LDL/HDL) significativamente mayores en los sujetos portadores del genotipo homocigoto para el alelo mayoritario (B1/B1) de este gen ³⁵¹

El presente trabajo avanza en la comprensión del papel que juegan los polimorfismos presentes en los genes que modulan las respuestas de lípidos y lipoproteínas de acuerdo con el tipo de leche que se consume. Los resultados genéticos explican en parte la variación en la respuesta individual observada. Sin embargo, debe recordarse que el consumo de leche en este estudio fue mayor que el consumo medio reportado de la población española (500 ml/día frente a 1 porción/día en 250 ml) ³⁵². Por otra parte, los resultados deben ser validados mediante estudios con un mayor número de participantes.

Por otra parte, la proporción de hombres ha resultado considerablemente mayor que la de las mujeres, y el sexo ha sido descrito como un factor determinante sobre el riesgo enfermedades cardiovasculares ³⁵³. De manera que sería de gran interés para explorar diferencias entre hombres y a mujeres en futuros estudios.

PPAR α juega un papel clave en la homeostasis de los lípidos, lo que contribuye a la regulación de las concentraciones de lípidos en diferentes niveles: transcripcional y post-translacional. Sin embargo, los mecanismos subyacentes a estos efectos no se entienden bien. Se necesita llevar a cabo más estudios para analizar los mecanismos moleculares específicos implicados en la regulación diferencial mediada por variantes genéticas como el rs135549 PPAR α , en las concentraciones de lípidos después del consumo de leche.

Este estudio proporciona sin embargo, la primera evidencia de que el polimorfismo perteneciente al gen rs135549 PPAR α modula los efectos de los diferentes tipos de leche en biomarcadores de riesgo cardiovascular. Los participantes portadores de la variante TT (47 % de la población estudiada) pueden beneficiarse significativamente de consumo de leche desnatada. En los individuos con las variantes CC o CT (53 % de la población), sin embargo, el consumo de leche semidesnatada o desnatada tendría efectos similares sobre los cocientes TC/HDL HDL/LDL.

Aunque se necesitan más estudios con un diseño prospectivo para confirmar los resultados actuales, estas diferencias genotípicas pueden ayudar a explicar la variabilidad de los resultados observados en estudios que evalúan el efecto de la grasa de la leche sobre el riesgo de enfermedades cardiovasculares.

5.3.2 “ESTUDIO DE INTERVENCIÓN NUTRICIONAL SOBRE LA EFICACIA DE LA INGESTA DIARIA DE UNA BEBIDA LÁCTEA EN VOLUNTARIOS SANOS CON SOBREPESO Y OBESIDAD”

5.3.2.1 Discusión de las características generales de la muestra estudiada

Con el objetivo de determinar el efecto de los componentes funcionales analizados en este estudio, resulta necesario realizar el análisis de los resultados teniendo en cuenta las características basales de la muestra estudiada. De esta manera, se ha comprobado que la aleatorización de los grupos en función del tratamiento ha permitido obtener dos grupos de intervención homogéneos.

No se han encontrado diferencias significativas entre los grupos estudiados en ninguna de las variables analizadas, lo que supone que los resultados de la intervención no son debidos a diferencias basales entre grupos de tratamiento.

5.3.2.1 Discusión de la valoración de la eficacia tras la intervención

El efecto potencial del uso de faseolaminas sobre la reducción del peso corporal y masa grasa se basa en la inhibición de la α -amilasa que conduce a una menor digestión, absorción y metabolismo de los carbohidratos y por tanto de su aporte calórico y a su efecto sobre la saciedad, mediado por un retraso en el vaciamiento gástrico ^{120,131,238}. Por este motivo, se

indicó que el consumo del batido se realizara junto a aquellas comidas en las que se concentraba la ingesta de hidratos de carbono.

Tras la intervención, se ha podido observar que ambos grupos mejoraron los parámetros antropométricos evaluados: peso, IMC, MG (kg y %). Sin embargo, no se han observado diferencias significativas entre los grupos.

Los ensayos clínicos realizados a la fecha con extractos de *Phaseolus vulgaris* a diferentes dosis muestran un efecto modesto, aunque no despreciable sobre el peso corporal y masa grasa, así en el estudio de *Udani et al.* (2004) de 8 semanas de duración y con dosis de 3000 mg/día administradas dos veces al día sólo se produjo una moderada y no significativa pérdida de peso/semana mayor en el grupo de estudio en relación al control. En una intervención posterior del mismo autor en 2007 de 4 semanas y 2000 mg/día (también administrados en 2 dosis) sólo se observaron diferencias significativas entre grupos en aquellos que tenían las ingestas de hidratos de carbono en el tercil más alto ^{127,354}. *Díaz et al.* (2004) con una dosis de 1000 mg/día no observó diferencias en ninguna de las variables antropométricas estudiadas ¹¹⁷.

En el estudio de *Celleno et al.* (2007) empleado en el cálculo muestral de este estudio, los autores obtuvieron diferencias significativas tanto para el peso corporal, masa grasa y circunferencias en relación al grupo control, sin embargo, existen diferencias en las características de la intervención que es importante aclarar:

- Se seleccionaron los participantes más adherentes antes de comenzar la intervención, lo que garantizaría un más estricto cumplimiento del protocolo. De hecho, el mismo autor sugiere que podrían deberse a esta preselección las diferencias observadas en los resultados en relación a otros estudios previos.
- En este estudio la dosis empleada fue de 445 mg/día, dosis 4 veces mayor a la suministrada con el batido en estudio y consistían en tabletas y no en un alimento lo cual puede influir sobre el cumplimiento de la pauta.
- En el estudio de referencia se concentraba todo el aporte de hidratos de carbono prácticamente en una sola comida junto a la que se tomaba la tableta. Esto es incompatible con realizar una dieta cercana a los hábitos recomendados, ya que unificar el consumo de todos los hidratos de carbono en una sola toma puede resultar demasiado saciante y difícil de realizar sobre todo en el caso de que las faseolaminas se administren en una bebida saborizada como en el estudio realizado.

- Las tabletas de estudio empleadas contenían cromo en una proporción 5 a 6 veces mayor a la del batido en estudio (50-60 µg versus 10 µg), nutriente que también podría influir sobre la pérdida de peso corporal ²³⁸.
- Los participantes no tenían indicada ningún tipo de restricción calórica, situación que se aleja de las recomendaciones indicadas de las guías de práctica clínica indicadas en personas con sobrepeso/obesidad.
- Su intervención sólo duró 30 días, sin embargo, es sabido que el cumplimiento de las pautas declina con el tiempo, sobre todo si va acompañado de restricción calórica.

Una similitud es que en el estudio de *Celleno et al.* (2007), la pérdida de peso resultó producirse fundamentalmente a base de masa grasa, situación que observamos también en el presente estudio, en el que a pesar de ser mayor la pérdida de peso media en el grupo control, la de masa grasa fue mayor en el de estudio ²³⁸.

En un estudio reciente realizado por *Grube et al.* (2014), tras la administración de 6 tabletas diarias (2 por comida) aportando un total de 3000 mg/día de principio activo, los autores observaron cambios significativos en la pérdida de peso corporal total, masa grasa y circunferencia de la cintura en relación al placebo, aunque estos cambios no se acompañaron de ningún cambio en los parámetros bioquímicos ¹¹⁸. Nuevamente en este caso se observan grandes diferencias tanto en la cantidad de principio activo suministrado como en la imposibilidad de repartirlo a lo largo del día. Por otro lado, el porcentaje del valor calórico total aportado por los hidratos de carbono de la dieta fue del 40 %. Esperando que porcentaje de absorción se reduce por el aporte de las faseolaminas, este porcentaje se quedaría bastante por debajo del recomendado para una dieta equilibrada orientada a la pérdida de peso ³⁹.

A diferencia de todos los estudios antes mencionados, el tratamiento estudio de este ensayo se ha realizado con 55 mg de faseolaminas (total 110 mg/día), cantidades inferiores a las empleadas en otros estudios, por lo que los efectos potenciales de las faseolaminas han podido no ser suficientes para observar cambios en estas variables en este estudio. Por lo tanto, los cambios antropométricos observados tras la intervención han resultado consecuencia de la dieta hipocalórica, sin aportar la bebida un efecto añadido.

Respecto al efecto del consumo de la bebida láctea “estudio” sobre diferentes parámetros del perfil lipídico, ha podido observarse una mayor reducción de los niveles medios en el grupo que consumió dicha bebida en varias de las variables estudiadas: colesterol total y ApoB1. Además,

mientras que el grupo control ha aumentado sus niveles medios de LDL, el grupo de estudio los ha reducido. Un 27.20 % del grupo de estudio ha reducido sus niveles de LDL en 15 o más mg/dl mientras que en el grupo control este porcentaje fue del 14.60 %. Lo mismo ha ocurrido en el caso del colesterol total que, dentro del grupo de estudio un 45.50 % redujo sus niveles de colesterol total en 15 o más mg/dl, mientras que este porcentaje fue del 34.00 % dentro del grupo control. El cambio en estos parámetros ha permitido también una mejora de los diferentes cocientes indicadores de riesgo cardiovascular (cocientes LDL/HDL, CT/HDL y ApoB/ApoA1) en relación al control.

Estos efectos podrían relacionarse tanto con el contenido de fibra y fructo-oligosacáridos como con la presencia de esteroides vegetales (1.5 g/batido), lo cuales poseen mostrado efecto sobre la reducción de las concentraciones de colesterol total y colesterol-LDL en las dosis administradas en la bebida de estudio (1.5 - 3.0 g/día) ¹⁵⁴.

Si comparamos los resultados obtenidos con otros alimentos funcionales enriquecidos con esteroides vegetales, podemos observar que la media de cambio de los niveles de LDL documentada en varios meta-análisis no se aleja tanto de los resultados obtenidos. *AbuMweis et al.* (2008) habla de una diferencia media de reducción de LDL en relación al control de -0.31 mmol/L (IC95 %: -0.27 a -0.35), *Demonty et al.* (2009) de -0.34 mmol/L (IC95 %: -0.31 a -0.36) y *Chen et al.* (2005) de -0.35 mmol/L; mientras que en el presente estudio ha resultado de 6.96 mg/dl ó 0.18 mmol/L (IC95 %: -0.17 a -0.18) ³⁵⁵⁻³⁵⁷. No obstante, es importante tener en cuenta que los meta-análisis mencionados agrupan estudios con gran variabilidad y heterogeneidad. Entre las posibles diferencias con estos estudios y que deberían tenerse en cuenta a la hora de evaluar los resultados se mencionan:

- La variabilidad de dosis y efecto dosis dependiente. Para un porcentaje de cambio en torno al 7-10 % se habla de dosis necesarias de 1.5-1.9 g/día de esteroides y 2-2.4 g/día de estanoles. En este caso se ha aportado la cantidad mínima (en caso de que se hubiese conservado al 100 %) por lo que también deberíamos esperar resultados en el rango inferior.
- La variabilidad en cuanto a las veces al día en que se reparte la dosis de esteroides y momento del día en que se administra. Algunos de los meta-análisis hablan de una mayor efectividad si se da en varias tomas, aunque no hay unanimidad en esto. En nuestro caso, se dio en una sola toma y la comida del día era variable siempre que se acompañara de hidratos de carbono.

- Los niveles basales de LDL de partida. En algunos estudios se parte de voluntarios con hipercolesterolemia.
- La matriz. Los esteroides unidos a grasas de untar parecen tener mejores resultados que en el caso de lácteos, aunque aquí tampoco se ha encontrado unanimidad.
- La influencia de otros ingredientes. Cabe destacar que otros ingredientes puedan tener mayor influencia al acompañar a los esteroides en la formulación y, en el caso del presente estudio, hay muchos más ingredientes involucrados que pueden haber influido. No tenemos la especificación de los diferentes tipos de fibra empleados, pero algunos estudios hablan de que el añadir fibra soluble junto a los esteroides podría reducir la efectividad de los mismos por aumentar la viscosidad intestinal y favorecer a un menor transporte de los esteroides al enterocito disminuyendo su eficiencia ³⁵⁸.

En relación a los marcadores del perfil de glucémico medidos tras las 14 semanas de intervención ha podido observarse que el grupo de estudio obtuvo una reducción media de la glucemia basal, insulina basal e índice HOMA mayor a la del grupo control, a pesar de no llegar a ser las diferencias estadísticamente significativas. Un 43.1 % de los participantes del grupo de estudio ha reducido el índice HOMA en 0.5 puntos o más mientras que en el grupo control este porcentaje ha resultado del 35 %. La dosis empleada en este caso también tendría interés, así en el estudio de Díaz *et al.* (2004) no observaron diferencias entre grupos con una dosis de 1000 mg/día, sin embargo, al aumentar la misma a 4000 mg/día se redujeron significativamente los niveles de glucemia e insulina basales tras la intervención sólo en el grupo de estudio ¹¹⁷.

A pesar de no existir diferencias significativas en el valor calórico indicado entre grupos, ni en la pauta dietética, es destacable la mejora en la calidad de la dieta que se logró con el consumo del tratamiento estudio. Se ha podido observar una interacción significativa entre el consumo de la bebida en estudio y la ingesta de fibra, vitamina B2, B6, B12, niacina, ácido fólico y vitamina E, K, biotina, ácido pantoténico, calcio, hierro, zinc, magnesio, manganeso, cromo y selenio. Esto permitiría compensar el descenso en el consumo de estos nutrientes y vitaminas propiciado por la restricción calórica de la dieta indicada, situación que suele observarse en cualquier pauta de indicación de dieta y que conlleva, en muchas ocasiones, a la necesidad de indicar suplementación con complejos vitamínicos.

Otro de los efectos atribuidos a los inhibidores de alfa amilasa es el retraso en el vaciamiento gástrico generando sensación de saciedad, lo que podría traducirse en una menor ingesta energética ³⁵⁹. En el presente estudio, el efecto más prolongado sobre la sensación de hambre

ha quedado reflejado en los resultados de Escala Analógica Visual (VAS). Si bien no se han observado diferencias estadísticamente significativas en la evaluación por medidas repetidas entre los grupos, puede observarse como el grupo que consumió la bebida estudio, mantuvo niveles más altos en las escalas de saciedad y plenitud y más bajos en las escalas de hambre y deseo de ingerir alimentos en relación a la bebida control en los distintos tiempos evaluados, siendo en el caso del deseo de ingerir alimentos dulces, grasos o sabrosos, cercano a la significación en los tiempos t2 y t4 (es decir, a los 60 y 120 min de iniciada la prueba). En el estudio de *Spadafranca et al.* (2013), el empleo de una escala similar a la empleada en este estudio reflejó un incremento significativo sobre la saciedad ¹³¹.

5.3.2.2 *Discusión de la evaluación de la seguridad y tolerancia*

En relación a la seguridad y tolerancia, todos los parámetros se han mantenido en rangos de normalidad en ambos grupos. En general los efectos gastrointestinales producidos por el tratamiento han resultado de carácter leve, salvo en tres voluntarios del grupo de estudio que abandonaron el mismo debido a un aumento del ritmo intestinal y la distensión abdominal (uno de los cuáles ya había declarado presentar intolerancias a determinados alimentos). En el resto de voluntarios los síntomas más frecuentes han sido el estreñimiento y la distensión abdominal, sin embargo, estos síntomas son frecuentes cuando se producen cambios en la dieta (como los que acompañaron a la intervención) no observándose diferencias significativas entre los que consumieron la bebida en estudio y la bebida control.

Dichos efectos secundarios (distensión abdominal y estreñimiento) también se han descrito en estudios previos con faseolaminas ¹²⁷. El aumento de la distensión abdominal podría asociarse a un incremento en la producción intestinal de hidrógeno mediado por la menor absorción de hidratos de carbono ³⁵⁹ y por la adición de fibra y fructo-oligosacáridos en el producto. Al igual que los efectos sobre la glucemia, grasa, etc., los niveles de faseolaminas empleados podrían influir sobre la presencia de los síntomas ³⁶⁰ por lo que en algunos casos podría ser necesario adaptar las cantidades a la tolerancia individual.

5.3.2.3 *Discusión de las variables de control de cumplimiento y percepción sensorial*

Las variables de dieta y ejercicio se controlaron durante todo el estudio. Ambos grupos recibieron las mismas indicaciones, sin embargo, ha podido constatarse que dentro del grupo control un mayor porcentaje de participantes (29 % vs 20 %) superaron los METs de ejercicio físico realizado en más del 125% de la media y, al mismo tiempo, un mayor porcentaje del grupo de estudio (50 % vs 41 %) no llegaron a cubrir un 75 % de los valores medios. A pesar de que estas diferencias entre grupos no han resultado significativas, es importante mencionarlas a la hora de valorar los resultados obtenidos.

En relación al consumo del tratamiento, la adherencia al consumo de los batidos ha resultado muy buena e incluso superior en el grupo de estudio, el cual mantuvo el porcentaje de consumo estable durante toda la intervención. Respecto a la valoración sensorial de ambos tratamientos también ha resultado favorable y sin diferencias también entre ambos grupos.

5.3.2.4 *Discusión del análisis genético sobre la respuesta al consumo de la bebida láctea*

Los resultados genéticos obtenidos mediante el análisis de medidas repetidas, en los que se ha evaluado la interacción de diferentes variables con los genotipos y el tratamiento a lo largo del tiempo, no han resultado significativos después del ajuste *post hoc*.

A su vez, aunque para el polimorfismo rs4988235 LCT (MCM6) y el rs2805533 ADARB2, el análisis de interacción ha sido significativo para el IMC y el peso, esta significación no se ha corroborado en el análisis *post hoc* y por tanto no parece debida a la diferencia de genotipos.

Aunque estudios previos han determinado una asociación de la variante -13910C>T rs4988235 LCT (MCM6) con el IMC y la obesidad,^{361–363} nuestros resultados de interacción no han salido concluyentes ya que muestran una bajada de peso mayor en el grupo estudio para los homocigotos comunes, pero sin embargo, también muestran una mayor bajada de peso los que han recibido el tratamiento control sobre los portadores del alelo minoritario.

Un estudio donde se analiza la variante rs2805533 ADARB2 ha mostrado una asociación significativa entre los portadores del genotipo AA y el índice de masa corporal en comparación

con los portadores del alelo G ²⁰⁸. Sin embargo, nuestros resultados de interacción no han resultado concluyentes ya que muestran una bajada de peso mayor en el grupo estudio para los homocigotos comunes, pero sin embargo, también muestran una mayor bajada de peso los que han recibido el tratamiento control sobre los portadores del alelo minoritario. Además, esta interacción solo ronda los límites de la significación.

Que los resultados del análisis genético no hayan mostrado diferencias significativas en función del tipo de tratamiento y los diferentes genotipos, no resulta extraño ya que los efectos provocados en el grupo tratamiento y el control, tampoco han resultado los esperados.

Una de las razones acerca de la carencia de resultados de interacción gen-dieta puede ser debida al tamaño muestral. Este cálculo en estudios clínicos requiere ser planteado de una forma cuidadosa y no existe un tamaño fijo, sino que se calcula para las necesidades de cada estudio, con el objetivo de establecer un balance entre las consideraciones estadísticas y los resultados clínicos ³⁶⁴. Sin embargo, no siempre es tarea fácil debido a las variables a estudiar o por el presupuesto económico disponible. Aunque el análisis de una gran población podría dar indicios de una diferencia estadísticamente significativa, es necesario que también posea importancia clínica desde el punto de vista del efecto evaluado (que puede ser muy reducido). Por otro lado, la realización de estudios de intervención nutricional con un tamaño muestral grande está condicionada a una limitación económica, ya que suponen un coste económico elevado en comparación con otro tipo de estudios, por ejemplo, observacionales.

Otra de las posibles de las posibles razones, sea debida a la diferencia de práctica de actividad física entre los grupos de tratamiento. El IMC y el peso, están directamente relacionados con el balance energético resultante de la ingesta de energía y la actividad física realizada. Como se ha comentado en el apartado de variables de control de cumplimiento, dentro del grupo control un mayor porcentaje de participantes (29 %) superaron los METs de ejercicio físico realizado en más del 125 % de la media, en comparación con el grupo estudio (20 %) y, al mismo tiempo, un mayor porcentaje del grupo de estudio (50 %) no llegó a cubrir un 75 % de los valores medios, en comparación con el grupo estudio (41 %). Por lo que los resultados obtenidos pueden deberse a dicha diferencia.

Si bien los resultados en algunos parámetros evaluados no alcanzan las diferencias significativas entre grupos, debe tenerse en cuenta que la cantidad de faseolaminas administrada en las bebidas es inferior a la aportada en estudios previos en los que este principio activo se usó como complemento alimentario o en otra matriz alimentaria diferente.

Actualmente no se ha encontrado bibliografía publicada sobre estudios de intervención con *phaseolaminas* que determinen la influencia genética para evaluar una diferente respuesta, por lo que dichos estudios pueden resultar necesarios para determinar el efecto de dichos componentes en función del componente genético.

6. CONCLUSIONES

6 CONCLUSIONES

- 1 La realización de ensayos clínicos nutrigenéticos y nutrigenómicos requiere una infraestructura que integre capacidades de planificación, reclutamiento y gestión de voluntarios, Comité de Ética, análisis genómico, análisis bioquímicos, análisis bioinformático y análisis estadístico. Se ha demostrado que el diseño de la Plataforma “Cantoblanco” de Genómica Nutricional y Alimentación (GENYAL) que ha sido objeto de implantación y desarrollo de esta Tesis Doctoral proporciona una herramienta científica adecuada para conocer los efectos de componentes bioactivos e ingredientes alimentarios en la salud y permitirá diseñar productos y estrategias nutricionales de precisión.
- 2 El estudio de asociación fenotipo-genotipo realizado en humanos mediante la Plataforma GENYAL ha permitido identificar polimorfismos de un solo nucleótido en genes del metabolismo que se asocian a estilos de vida y fenotipos específicos, como es el caso de la asociación del rs780094 del gen GCKR con la práctica habitual de actividad física, el rs3856806 del gen PPAR γ al índice cintura-cadera, el rs1800588 del gen LPC y los rs429358 y rs7412 del gen APOE a los niveles de colesterol, o el rs328 del gen LPL con los niveles de triglicéridos.
- 3 El análisis de interacción de las variables genéticas en función del fenotipo y la alimentación realizado en humanos mediante la Plataforma GENYAL, ha permitido identificar que la variante del polimorfismo rs3749474 del gen CLOCK, se asocia a un aumento de quince unidades del índice cintura-cadera, en función del grado de apetito.
- 4 El estudio nutrigenético asociado a una intervención dietética consistente en el consumo diario de leche enriquecida con ácidos grasos poliinsaturados omega-3, ácido oleico y vitaminas, revela que las variantes rs135551 del gen PPAR α y rs2205895 del gen SELP identifican a un porcentaje de población susceptible de beneficiarse más del efecto saludable de los componentes bioactivos de este alimento funcional en lo referente a prevención de riesgo cardiovascular. Los resultados de este estudio son indicativos de que la hipótesis de la nutrición personalizada se cumple, es decir, distintas personas se pueden beneficiar en diferente grado del consumo de un mismo producto alimentario de uso para la salud, según sea su genotipo.

- 5 Del estudio nutrigenético asociado a la intervención dietética con leche enriquecida con ácidos grasos poliinsaturados omega-3, ácido oleico y vitaminas puede concluirse también que el polimorfismo de un solo nucleótido rs135549 del gen PPAR α identifica a personas susceptibles de beneficiarse más del consumo de leche desnatada en la prevención de enfermedad cardiovascular, de forma que el genotipo común se asocia con una reducción de marcadores de riesgo cardiovascular después de consumir leche desnatada, y un aumento después de consumir leche semidesnatada.
- 6 La realización de un ensayo de intervención con una bebida láctea con inhibidores de α -amilasa, ha puesto de manifiesto que no siempre es evidente la identificación de la influencia del perfil genético en el efecto de productos diseñados para proporcionar efectos saludables. En este caso, se ha demostrado que el empleo del producto dentro del contexto de una dieta hipocalórica equilibrada, en población con sobrepeso y obesidad, puede resultar beneficioso al contribuir a mejorar el perfil glucémico y lipídico, favoreciendo la pérdida de masa grasa. Sin embargo, la falta de un beneficio biológico significativo limita la identificación de variantes genéticas que marquen la susceptibilidad de respuesta al producto. De este resultado se puede concluir que la nutrición personalizada se apoya en factores no solo biológicos, sino que los aspectos tecnológicos, que afectan al correcto diseño y desarrollo de los productos alimentarios de uso para la salud, son también determinantes en el éxito de las estrategias de la nutrición personalizada.

6. BIBLIOGRAFÍA

7 BIBLIOGRAFÍA

1. OMS | Enfermedades crónicas. *WHO* Disponible en:
http://www.who.int/topics/chronic_diseases/es/.
2. Salas-Salvadó, J., Rubio, M. A., Barbany, M. & Moreno, B. Consenso SEEDO 2007 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica. *Med. Clínica* **128**, 184–196 (2007).
3. World Health Organization WHO. *Obesity: preventing and managing the global epidemic*. 252 (World Health Organization WHO, 2000).
4. WHO Expert Committee. *Physical status: the use and interpretation of anthropometry*. 452 (World Health Organization, WHO, 1995).
5. Vague, J. La différenciation sexuelle; facteur déterminant des formes de l'obésité. *Presse Médicale* **55**, 339 (1947).
6. Pérez Sanz Miguel, M. ^a J., Cabrera Parra, W., Varela Moreiras, G. & Garaulet, M. Distribución regional de la grasa corporal: Uso de técnicas de imagen como herramienta de diagnóstico nutricional. *Nutr. Hosp.* **25**, 207–223 (2010).
7. Monserrat Verdalet Olmedo. La obesidad: un problema de salud pública. *Rev. Divulg. Científica Tecnológica Univ. Veracruzana* **24**, (2011).
8. World Health Organization WHO. *WHO/Europe approaches to obesity. Obesity*. (2016).
9. Serra Majem, L. *et al.* Obesidad infantil y juvenil en España. Resultados del Estudio enKid (1998-2000). *Med. Clínica* **121**, 725–732 (2003).
10. Aranceta-Bartrina, J., Serra-Majem, L., Foz-Sala, M. & Moreno-Esteban, B. Prevalencia de obesidad en España. *Med. Clínica* **125**, 460–466 (2005).
11. Aranceta-Bartrina, J., Pérez-Rodrigo, C., Alberdi-Aresti, G., Ramos-Carrera, N. & Lázaro-Masedo, S. Prevalencia de obesidad general y obesidad abdominal en la población adulta española (25–64 años) 2014–2015: estudio ENPE. *Rev. Esp. Cardiol.* **69**, 579–587 (2016).

12. González Jiménez, E. Obesidad: análisis etiopatogénico y fisiopatológico. *Endocrinol. Nutr.* **60**, 17–24 (2013).
13. Redinger, R. N. Fat storage and the biology of energy expenditure. *Transl. Res.* **154**, 52–60 (2009).
14. Singh, M. Mood, food, and obesity. *Front. Psychol.* **5**, (2014).
15. Lourenço Nogueira, T. Análisis de la implicación de diferentes factores reguladores del apetito y del estado nutricional en pacientes con anorexia nerviosa con bajo peso constitucional. (Universidad Autónoma de Madrid, 2007).
16. Brand-Miller, J. C., Holt, S. H. A., Pawlak, D. B. & McMillan, J. Glycemic index and obesity. *Am. J. Clin. Nutr.* **76**, 281S–5S (2002).
17. Galvão Cândido, F., Silva Ton, W. T. & Gonçalves Alfenas, R. de C. Addition of dietary fiber sources to shakes reduces postprandial glycemia and alters food intake. *Nutr. Hosp.* **31**, 299–306 (2015).
18. Badman, M. K. & Flier, J. S. The Gut and Energy Balance: Visceral Allies in the Obesity Wars. *Science* **307**, 1909–1914 (2005).
19. Holness, M. J., Hegazy, S. & Sugden, M. C. Signalling satiety and starvation to β -Cell insulin secretion. *Curr. Diabetes Rev.* **7**, 336–345 (2011).
20. Jakobsdottir, S. *et al.* Acute and short term effects of caloric restriction on metabolic profile and brain activation in obese, postmenopausal women. *Int. J. Obes.* **2005** (2016). doi:10.1038/ijo.2016.103
21. Ghamari-Langroudi, M., Colmers, W. F. & Cone, R. D. PYY3-36 inhibits the action potential firing activity of POMC neurons of arcuate nucleus through postsynaptic Y2 receptors. *Cell Metab.* **2**, 191–199 (2005).
22. Wynne, K., Stanley, S., McGowan, B. & Bloom, S. Appetite control. *J. Endocrinol.* **184**, 291–318 (2005).

23. Tapia González, S. Efecto de los mediadores metabólicos leptina, IL-6 y estradiol en la activación microglial e implicación en la homeostasis energética en diferentes modelos de inflamación sistémica crónica. (Universidad Autónoma de Madrid, 2010).
24. Morales, M. I. C. *Obesidad y trastorno por atracón: Ensayo para comprender y tratar la obesidad*. (Editorial Grupo 5, 2015).
25. Aune, D. *et al.* BMI and all cause mortality: systematic review and non-linear dose-response meta-analysis of 230 cohort studies with 3.74 million deaths among 30.3 million participants. *BMJ* **353**, i2156 (2016).
26. Muñoz, M., Mazure, R. A. & Culebras, J. M. Obesidad y sistema inmune. *Nutr. Hosp.* **19**, 319–324 (2004).
27. Bello Rodríguez, B. *et al.* Síndrome Metabólico: un problema de salud con múltiples definiciones. *Rev. Médica Electrónica* **34**, 199–213 (2012).
28. García-García, E. *et al.* La obesidad y el síndrome metabólico como problema de salud pública: una reflexión. *Salud Pública México* **50**, 530–547 (2008).
29. Hernández, E. Síndrome metabólico y enfermedad coronaria: una asociación común. *Rev. Colomb. Cardiol.* **19**, 119–120 (2012).
30. Alberti, K. G. M. M. *et al.* Harmonizing the Metabolic Syndrome A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. *Circulation* **120**, 1640–1645 (2009).
31. Huang, C.-J. *et al.* Obesity-Related Oxidative Stress: the Impact of Physical Activity and Diet Manipulation. *Sports Med. - Open* **1**, (2015).

32. Vincent, H. K., Innes, K. E. & Vincent, K. R. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. *Diabetes Obes. Metab.* **9**, 813–839 (2007).
33. Goroll, A. H. & Jr, A. G. M. *Primary Care Medicine: Office Evaluation and Management of The Adult Patient: Sixth Edition*. (Lippincott Williams & Wilkins, 2011).
34. Moreno, B. & Esteban, B. M. *La obesidad en el tercer milenio*. (Ed. Médica Panamericana, 2006).
35. José Luis Fernández Nuevo, Lara Gago & Javier Benito. *Informe de Vigilancia Tecnológica madri+d “Panorama Actual de la Nutrigenómica*. (Fundación madri+d para el Conocimiento, 2011).
36. Rossen, L. M. & Rossen, E. A. *Obesity 101*. (Springer Publishing Company, 2011).
37. Goyenechea, E., Abete, I., Martínez-Urbistondo, D. & Alfredo Martínez, J. Respuesta a la dieta en función del genotipo: hacia una nutrición personalizada en el obeso. *Clínica E Investig. En Arterioscler.* **22**, 10–13 (2010).
38. Rubio Herrera, M. & Moreno Lopera, C. Medicina basada en la evidencia: nutrición en la obesidad. *Endocrinol. Nutr.* **52**, 102–109 (2005).
39. Consenso FESNAD-SEEDO. Recomendaciones nutricionales basadas en la evidencia para la prevención y el tratamiento del sobrepeso y la obesidad en adultos (Consenso FESNAD-SEEDO). *Rev. Esp. Obes.* **10**, 80 (2011).
40. Rock, C. L. *et al.* Randomized clinical trial of portion-controlled prepackaged foods to promote weight loss. *Obes. Silver Spring Md* **24**, 1230–1237 (2016).
41. OMS | ¿Qué son las enfermedades cardiovasculares? *WHO* Disponible en: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/about_cvd/es/.
42. *Libro de la salud cardiovascular del Hospital Clínico San Carlos y la Fundación BBVA*. (Fundación BBVA, 2009).

43. 1a. Conferencia de Prevención y Promoción de la Salud en la Práctica Clínica en España. (Semfyc, 2007).
44. OMS | Enfermedades cardiovasculares. WHO Disponible en:
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/>.
45. Kellogg España. *Manual Práctico de Nutrición y Salud Kellogg's*. (Exlibris Ediciones, 2012).
46. Sociedad Española de Cardiología & Fundación Española del corazón. *Informe de la salud cardiovascular en España en el contexto europeo*. 33 (2006).
47. Zugasti Murillo, A. & Moreno Esteban, B. Obesidad como factor de riesgo cardiovascular. *Hipertens. Riesgo Vasc.* **22**, 32–36 (2005).
48. Portilla, E. C., Muñoz, W. & Sierra, C. H. Genes y variantes polimórficas asociadas a la enfermedad cardiovascular. *Rev. Colomb. Cardiol.* **21**, 318–326 (2014).
49. Kathiresan, S. & Srivastava, D. Genetics of Human Cardiovascular Disease. *Cell* **148**, 1242–1257 (2012).
50. Guía europea sobre prevención de la enfermedad cardiovascular en la práctica clínica (versión 2012). *Rev. Esp. Cardiol.* **65**, 937.e1-937.e66 (2012).
51. Torres, Y. Y. O., Rojas, N. B. A., Herrera, A. D., de la Noval, R. & González, M. A. Prevención primaria de la cardiopatía isquémica. Aspectos de interés. *Rev. Cuba. Cardiol. Cir. Cardiovasc.* **21**, 24–31 (2015).
52. Velasco, J. A. *et al.* Guías de práctica clínica de la Sociedad Española de Cardiología en prevención cardiovascular y rehabilitación cardíaca. *Rev. Esp. Cardiol.* **53**, 1095–1120 (2000).
53. Waring, W. S. *Cardiovascular Risk Management*. (Elsevier Health Sciences, 2006).
54. Bope, E. T. & Kellerman, R. D. *Conn's Current Therapy 2014*. (Elsevier Health Sciences, 2013).

55. Wei, M., Mitchell, B. D., Haffner, S. M. & Stern, M. P. Effects of cigarette smoking, diabetes, high cholesterol, and hypertension on all-cause mortality and cardiovascular disease mortality in Mexican Americans. The San Antonio Heart Study. *Am. J. Epidemiol.* **144**, 1058–1065 (1996).
56. González, M. & Ignacio, M. Circunferencia de cintura: una medición importante y útil del riesgo cardiometabólico. *Rev. Chil. Cardiol.* **29**, 85–87 (2010).
57. Franco, O. H. Effects of Physical Activity on Life Expectancy With Cardiovascular Disease. *Arch. Intern. Med.* **165**, 2355 (2005).
58. Hernández, J. E. & Montero, J. M. S. R. *Factores de riesgo en la cardiopatía isquémica*. (Librería-Editorial Dykinson, 2010).
59. Smith, P. J. & Blumenthal, J. A. Aspectos psiquiátricos y conductuales de la enfermedad cardiovascular: epidemiología, mecanismos y tratamiento. *Rev. Esp. Cardiol.* **64**, 924–933 (2011).
60. Sociedad Española de Directivos de la Salud (SEDISA). *Soluciones para la gestión de la cronicidad*. (2015).
61. Consulta Mixta de Expertos OMS/FAO. *Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas*. (Organización mundial de la Salud, OMS, 2003).
62. World Health Organization, WHO. *Global status report on noncommunicable diseases 2014*. (WHO, 2014).
63. Minihane, A. M. *et al.* Low-grade inflammation, diet composition and health: current research evidence and its translation. *Br. J. Nutr.* **114**, 999–1012 (2015).
64. Leal, É. A. C. & García, J. S. Obesidad, síndrome metabólico y su impacto en las enfermedades cardiovasculares. *Rev. Bioméd.* **22**, 103–115 (2011).
65. Sharma, P. Inflammation and the Metabolic Syndrome. *Indian J. Clin. Biochem.* **26**, 317–318 (2011).

66. Pan, M.-H., Lai, C.-S. & Ho, C.-T. Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids. *Food Funct.* **1**, 15–31 (2010).
67. León-Pedroza, J. I. *et al.* Inflamación sistémica de grado bajo y su relación con el desarrollo de enfermedades metabólicas: de la evidencia molecular a la aplicación clínica. *Cir. Cir.* **83**, 543–551 (2015).
68. Luis Alonso González Naranjo & José Fernando Molina Restrepo. Evaluación de la inflamación en el laboratorio. *Asoc. Colomb. Reumatol.* **17**, 35–47 (2010).
69. Reinehr, T. *et al.* Inflammatory Markers in Obese Adolescents with Type 2 Diabetes and Their Relationship to Hepatokines and Adipokines. *J. Pediatr.* **173**, 131–135 (2016).
70. Bing, C. Is interleukin-1 β a culprit in macrophage-adipocyte crosstalk in obesity? *Adipocyte* **4**, 149–152 (2015).
71. Khan, R., Spagnoli, V., Tardif, J.-C. & L'Allier, P. L. Novel anti-inflammatory therapies for the treatment of atherosclerosis. *Atherosclerosis* **240**, 497–509 (2015).
72. Acosta García, E. Obesidad, tejido adiposo y resistencia a la insulina. *Acta Bioquímica Clínica Latinoam.* **46**, 183–194 (2012).
73. Pène, J. *et al.* Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated Th17 lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **180**, 7423–7430 (2008).
74. Manzur, F., Alvear, C. & Alayón, A. N. Adipocitos, obesidad visceral, inflamación y enfermedad cardiovascular. *Rev. Colomb. Cardiol.* **17**, 207–213 (2010).
75. Ramírez Alvarado, M. ^a M. & Sánchez Roitz, C. Relación entre los niveles séricos de la proteína C reactiva y medidas antropométricas: una revisión sistemática de los estudios realizados en Suramérica. *Nutr. Hosp.* **27**, 971–977 (2012).
76. Loria Kohen, V. *et al.* Parámetros hormonales e inflamatorios en un grupo de mujeres con sobrepeso/obesidad. *Nutr. Hosp.* **26**, 884–889 (2011).

77. Cardiovascular disease risk factors - Diet | World Heart Federation. Disponible en: <http://www.world-heart-federation.org/cardiovascular-health/cardiovascular-disease-risk-factors/diet/>.
78. What are Lipoproteins? *News-Medical.net* (2009). Disponible en: <http://www.news-medical.net/life-sciences/What-are-Lipoproteins.aspx>.
79. Kingsbury, K. J. & Bondy, G. Understanding the essentials of blood lipid metabolism. *Prog. Cardiovasc. Nurs.* **18**, 13–18 (2003).
80. APOB apolipoprotein B [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/338>.
81. Díaz, J. A., Castro, M. & Liem, A. Utilidad de la medición de la apolipoproteína B en la práctica clínica. *Clínica E Investig. En Arterioscler.* **17**, 142–146 (2005).
82. Niu, W., Qi, Y., Qian, Y., Gao, P. & Zhu, D. The relationship between apolipoprotein E e2/e3/e4 polymorphisms and hypertension: a meta-analysis of six studies comprising 1812 cases and 1762 controls. *Hypertens. Res.* **32**, 1060–1066 (2009).
83. Alfaro, E. F. *et al.* Marcadores genéticos relacionados con el desarrollo de síndrome metabólico y riesgo de enfermedad coronaria cardiaca. *Acta Univ.* **25**, 9–13 (2015).
84. Marrzoq, L. F. A., Sharif, F. A. & Abed, A. A. Relationship between ApoE gene polymorphism and coronary heart disease in Gaza Strip. *J. Cardiovasc. Dis. Res.* **2**, 29–35 (2011).
85. Arruda, R. M. P., Peotta, V. A., Meyrelles, S. S. & Vasquez, E. C. Evaluation of vascular function in apolipoprotein E knockout mice with angiotensin-dependent renovascular hypertension. *Hypertension* **46**, 932–936 (2005).
86. Liu, C.-C., Kanekiyo, T., Xu, H. & Bu, G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms, and therapy. *Nat. Rev. Neurol.* **9**, 106–118 (2013).

87. Gao, J. *et al.* Involvement of Apolipoprotein E in Excess Fat Accumulation and Insulin Resistance. *Diabetes* **56**, 24–33 (2007).
88. Zaiou, M. *et al.* Apolipoprotein E; low density lipoprotein receptor interaction. Influences of basic residue and amphipathic alpha-helix organization in the ligand. *J. Lipid Res.* **41**, 1087–1095 (2000).
89. Wilson, P. W. F., Schaefer, E. J., Larson, M. G. & Ordovas, J. M. Apolipoprotein E Alleles and Risk of Coronary Disease A Meta-analysis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **16**, 1250–1255 (1996).
90. Garcia-Rios, A., Perez-Martinez, P., Delgado-Lista, J., Lopez-Miranda, J. & Perez-Jimenez, F. Nutrigenetics of the lipoprotein metabolism. *Mol. Nutr. Food Res.* **56**, 171–183 (2012).
91. Walz, C. P., Barry, A. R. & Koshman, S. L. Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation in the prevention of cardiovascular disease. *Can. Pharm. J. CPJ Rev. Pharm. Can. RPC* **149**, 166–173 (2016).
92. Samieri, C. *et al.* ω -3 fatty acids and cognitive decline: modulation by ApoE ϵ 4 allele and depression. *Neurobiol. Aging* **32**, 2317.e13-22 (2011).
93. Majem, L. S., Ángel Gil Hernández & Javier Aranceta Bartrina. *Libro blanco de los Omega 3 / Ácidos grasos omega-3 y salud.* (2013).
94. Funk, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* **294**, 1871–1875 (2001).
95. Sanders, T. A. Polyunsaturated fatty acids in the food chain in Europe. *Am. J. Clin. Nutr.* **71**, 176S–8S (2000).
96. Fernández Navarro, J. R. Suplementación de la dieta con aceite de pescado rico en ácidos grasos poliinsaturados n-3, estrategias a practicar para potenciar su consumo. (Editorial de la Universidad de Granada, 2007).

97. Nakamura, M. T. & Nara, T. Y. Essential fatty acid synthesis and its regulation in mammals. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **68**, 145–150 (2003).
98. Federación Española de Sociedades de Nutrición, Alimentación y Dietética FESNAD. Consenso sobre las grasas y aceites en la alimentación de la población española adulta. (2016).
99. Patterson, E. *et al.* Health Implications of High Dietary Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids, Health Implications of High Dietary Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids. *J. Nutr. Metab. J. Nutr. Metab.* **2012**, **2012**, e539426 (2012).
100. Hernandez, A. G. (DRT). *Tratado de Nutrición: Bases Fisiológicas y bioquímicas de la nutrición*. (Ed. Médica Panamericana, 2010).
101. United States Department of Agriculture. USDA Food Composition Databases. Disponible en: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/search>.
102. Cottin, S. C., Sanders, T. A. & Hall, W. L. The differential effects of EPA and DHA on cardiovascular risk factors. *Proc. Nutr. Soc.* **70**, 215–231 (2011).
103. Dyerberg, J., Bang, H. O. & Hjerne, N. Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos. *Am. J. Clin. Nutr.* **28**, 958–966 (1975).
104. Anderson, J. S. *et al.* Associations of plasma phospholipid omega-6 and omega-3 polyunsaturated Fatty Acid levels and MRI measures of cardiovascular structure and function: the multiethnic study of atherosclerosis. *J. Nutr. Metab.* **2011**, 315134 (2011).
105. Chang, C. L., Seo, T., Du, C. B., Accili, D. & Deckelbaum, R. J. n-3 Fatty acids decrease arterial low-density lipoprotein cholesterol delivery and lipoprotein lipase levels in insulin-resistant mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 2510–2517 (2010).
106. López Farré, A. & Macaya, C. Efectos antitrombóticos y antiinflamatorios de los ácidos grasos omega-3. *Rev. Esp. Cardiol.* **6**, 31–37 (2006).

107. Julio César Fernández Travieso. Ácidos grasos omega-3 y prevención cardiovascular. *Rev. CENIC Cienc. Biológicas Cent. Nac. Investig. Científicas* **41**, 3–15 (2010).
108. Cicero, A. F. G., Ertek, S. & Borghi, C. Omega-3 polyunsaturated fatty acids: their potential role in blood pressure prevention and management. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **7**, 330–337 (2009).
109. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific Opinion on the Tolerable Upper Intake Level of eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA) and docosapentaenoic acid (DPA): Tolerable Upper Intake Level of EPA, DHA and DPA. *EFSA J.* **10**, (2012).
110. Commission of the European Communities & Scientific Committee for Food. *Reports of the Scientific Committee for Food: nutrient and energy intakes for the European Community*. (Commission of the European Communities, Directorate-General Telecommunications, Information Industries and Innovation, 1993).
111. Joint FAO/WHO Expert Consultation on Fats and Fatty Acids in Human Nutrition. *Interim Summary of Conclusions and Dietary Recommendations on Total Fat & Fatty Acids*. (World Health Organization WHO, 2008).
112. European Food Safety Authority (EFSA). Labelling reference intake values for n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *EFSA J.* **7**, n/a-n/a (2009).
113. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, *trans* fatty acids, and cholesterol: Dietary reference values for fats. *EFSA J.* **8**, (2010).
114. Sanz París, A., Marí Sanchis, A., García Malpartida, K. & García Gómez, M. C. Propuesta de perfil de ácidos grasos omega 3 en nutrición enteral. *Nutr. Hosp.* **27**, 1782–1802 (2012).

115. Gregorio Varela Moreiras *et al.* *Valoración de la Dieta Española de acuerdo al Panel de Consumo Alimentario*. (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Fundación Española de la Nutrición, 2008).
116. González-Rodríguez, L. G., Aparicio, A., López-Sobaler, A. M. & Ortega, R. M. Omega 3 and omega 6 fatty acids intake and dietary sources in a representative sample of Spanish adults. *Int. J. Vitam. Nutr. Res. Int. Z. Für Vitam.-Ernährungsforschung J. Int. Vitaminol. Nutr.* **83**, 36–47 (2013).
117. Díaz B, E., Aguirre P, C. & Gotteland R, M. Efecto de un inhibidor de α -amilasa sobre la reducción de peso de mujeres obesas. *Rev. Chil. Nutr.* **31**, 306–317 (2004).
118. Grube, B., Chong, W.-F., Chong, P.-W. & Riede, L. Weight reduction and maintenance with IQP-PV-101: a 12-week randomized controlled study with a 24-week open label period. *Obes. Silver Spring Md* **22**, 645–651 (2014).
119. Bowman, D. E. Amylase Inhibitor of Navy Beans. *Science* **102**, 358–359 (1945).
120. Barrett, M. L. & Udani, J. K. A proprietary alpha-amylase inhibitor from white bean (*Phaseolus vulgaris*): a review of clinical studies on weight loss and glycemic control. *Nutr. J.* **10**, 24 (2011).
121. Obiro, W. C., Zhang, T. & Jiang, B. The nutraceutical role of the *Phaseolus vulgaris* alpha-amylase inhibitor. *Br. J. Nutr.* **100**, 1–12 (2008).
122. García, R. & Victoria, M. Extracción y purificación del inhibidor de α -amilasa de diferentes variedades mejoradas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y su efecto in vivo. (2014).
123. Udani, J. K., Singh, B. B., Barrett, M. L. & Preuss, H. G. Lowering the glycemic index of white bread using a white bean extract. *Nutr. J.* **8**, 52 (2009).
124. Layer, P., Carlson, G. L. & DiMagno, E. P. Partially purified white bean amylase inhibitor reduces starch digestion in vitro and inactivates intraduodenal amylase in humans. *Gastroenterology* **88**, 1895–1902 (1985).

125. Layer, P., Rizza, R. A., Zinsmeister, A. R., Carlson, G. L. & DiMagno, E. P. Effect of a purified amylase inhibitor on carbohydrate tolerance in normal subjects and patients with diabetes mellitus. *Mayo Clin. Proc.* **61**, 442–447 (1986).
126. Layer, P., Zinsmeister, A. R. & DiMagno, E. P. Effects of decreasing intraluminal amylase activity on starch digestion and postprandial gastrointestinal function in humans. *Gastroenterology* **91**, 41–48 (1986).
127. Udani, J., Hardy, M. & Madsen, D. C. Blocking carbohydrate absorption and weight loss: a clinical trial using Phase 2 brand proprietary fractionated white bean extract. *Altern. Med. Rev. J. Clin. Ther.* **9**, 63–69 (2004).
128. Tormo, M. A., Gil-Exojo, I., Romero de Tejada, A. & Campillo, J. E. Hypoglycaemic and anorexigenic activities of an alpha-amylase inhibitor from white kidney beans (*Phaseolus vulgaris*) in Wistar rats. *Br. J. Nutr.* **92**, 785–790 (2004).
129. Fantini, N. *et al.* Reducing effect of a *Phaseolus vulgaris* dry extract on food intake, body weight, and glycemia in rats. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 9316–9323 (2009).
130. Loi, B. *et al.* Reducing effect of an extract of *Phaseolus vulgaris* on food intake in mice--focus on highly palatable foods. *Fitoterapia* **85**, 14–19 (2013).
131. Spadafranca, A. *et al.* *Phaseolus vulgaris* extract affects glycometabolic and appetite control in healthy human subjects. *Br. J. Nutr.* **109**, 1789–1795 (2013).
132. Chokshi, D. Toxicity studies of Blockal, a dietary supplement containing Phase 2 Starch Neutralizer (Phase 2), a standardized extract of the common white kidney bean (*Phaseolus vulgaris*). *Int. J. Toxicol.* **25**, 361–371 (2006).
133. Nicolosi R, Hughes D & Bechtel D. *Evaluation of the Generally Recognized as Safe (GRAS) status of Phase 2® white bean (Phaseolus vulgaris) extract.* (Cantox Health Sciences International, 2007).

134. Pharmachem Laboratories, Inc. Phase 2 White Bean Extract Receives GRAS Status. (2006). Disponible en: <http://newhope.com/regulatory/phase-2-white-bean-extract-receives-gras-status>.
135. Pharmachem Laboratories, Inc. *Science Dossier: Fractionated White Bean Extract Evolves From Over 60 Years of Research on Legume-Based Amylase Inhibitors*. 477 (Pharmachem Laboratories, Inc, 2014).
136. Ha, M. A., Jarvis, M. C. & Mann, J. I. A definition for dietary fibre. *Eur. J. Clin. Nutr.* **54**, 861–864 (2000).
137. American association of cereal AACC. The Definition of Dietary Fiber. *Cereal Foods World* **46**, 112–126 (2001).
138. Escudero Álvarez, E. & González Sánchez, P. La fibra dietética. *Nutr. Hosp.* **21**, 61–72 (2006).
139. Le Blay, G. M., Michel, C. D., Blottière, H. M. & Cherbut, C. J. Raw potato starch and short-chain fructo-oligosaccharides affect the composition and metabolic activity of rat intestinal microbiota differently depending on the caecocolonic segment involved. *J. Appl. Microbiol.* **94**, 312–320 (2003).
140. Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición AESAN. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre condiciones de uso de determinadas sustancias distintas de vitaminas, minerales y plantas para ser empleadas en complementos alimenticios. *Rev. Com. Científico AESAN* **17**, (2013).
141. Gibson, G. R. & Roberfroid, M. *Handbook of Prebiotics*. (CRC Press, 2008).
142. Slavin, J. L. Position of the American Dietetic Association: health implications of dietary fiber. *J. Am. Diet. Assoc.* **108**, 1716–1731 (2008).

143. Hess, J. R., Birkett, A. M., Thomas, W. & Slavin, J. L. Effects of short-chain fructooligosaccharides on satiety responses in healthy men and women. *Appetite* **56**, 128–134 (2011).
144. Achour, L. *et al.* Metabolic effects of digestible and partially indigestible cornstarch: a study in the absorptive and postabsorptive periods in healthy humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **66**, 1151–1159 (1997).
145. Marin, L. M. *Comprender el colesterol*. (Editorial AMAT, 2011).
146. Marisela, G., Suhey, P., Yolmar, V. & Colina, J. Valores de referencia de carbohidratos para la población venezolana. *Arch. Latinoam. Nutr.* **63**, 301–314 (2013).
147. Aumentar el consumo de fibra prolonga la supervivencia tras un infarto de miocardio. - Noticias de la Sedca. Disponible en: <http://www.nutricion.org/noticias/noticia.asp?id=79>.
148. Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN). *ENIDE: Encuesta Nacional de Ingesta Dietética (2009-2010)*.
149. Meco López, J. F., Pascual Fuster, V. & Solà Alberich, R. La utilización de los esteroides vegetales en la práctica clínica: de la química a la clínica. *Clínica E Investig. En Arterioscler.* (2016). doi:10.1016/j.arteri.2016.04.001
150. *El libro blanco de los esteroides vegetales en alimentación*. (Instituto Flora, 2005).
151. Ros, E. Doble inhibición del colesterol: papel de la regulación intestinal y hepática. *Rev. Esp. Cardiol.* **6**, 52–62 (2006).
152. Plat, J. & Mensink, R. P. Increased intestinal ABCA1 expression contributes to the decrease in cholesterol absorption after plant stanol consumption. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **16**, 1248–1253 (2002).
153. A. Palou, P. Oliver & C. Pico. Los esteroides vegetales en la alimentación funcional. *Aliment. Nutr. Salud* **14**, 102–110 (2007).

154. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to 3 g/day plant sterols/stanols and lowering blood LDL-cholesterol and reduced risk of (coronary) heart disease pursuant to Article 19 of Regulation (EC) No 1924/2006: Plant Sterols and Stanols and Blood Cholesterol. **10**, (2012).
155. Ras, R. T., Geleijnse, J. M. & Trautwein, E. A. LDL-cholesterol-lowering effect of plant sterols and stanols across different dose ranges: a meta-analysis of randomised controlled studies. *Br. J. Nutr.* **112**, 214–219 (2014).
156. Fundación Española de Dietistas-Nutricionistas FED-N. *Esteroles vegetales para adultos con hipercolesterolemia moderada*. (2013).
157. European Food Information Council EUFIC. Los esteroides y estanoles vegetales reducen el colesterol. Disponible en: <http://www.eufic.org/article/es/artid/esteroides-estanoles-vegetales-colesterol/>.
158. Cummings, M. *Human Heredity: Principles and Issues*. (Cengage Learning, 2015).
159. Departamento Genética Universidad de Navarra. Human Molecular Genetics. Tema 1.2 Geografía del Genoma Humano. Human Molecular Genetics. Universidad de Navarra. Disponible en: <http://www.unav.es/ocw/genetica/tema-1-2.html>.
160. Lander, E. S. *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860–921 (2001).
161. Venter, J. C., Smith, H. O. & Adams, M. D. The Sequence of the Human Genome. *Clin. Chem.* **61**, 1207–1208 (2015).
162. Learn Science at Scitable Nature Education. single nucleotide polymorphism / SNP |. Disponible en: <http://www.nature.com/scitable/definition/single-nucleotide-polymorphism-snp-295>.

163. Departamento Genética Universidad de Navarra. Human Molecular Genetics. Tema 1.1. Historia y desarrollo del Proyecto del Genoma Humano. (2012). Disponible en: <http://www.unav.es/ocw/genetica/tema-1-1.html>.
164. Alliance, G. & ScreeningServices, T. N. Y.-M.-A. C. for G. and N. *Genética 101*. (Genetic Alliance, 2009).
165. Collins, D. W. & Jukes, T. H. Rates of transition and transversion in coding sequences since the human-rodent divergence. *Genomics* **20**, 386–396 (1994).
166. Srivastava, S., Brenner, D. E. & Rennert, G. *Selected Papers from the 2nd Haifa Cancer Prevention Workshop*. (IOS Press, 2007).
167. Information, N. C. for B., Pike, U. S. N. L. of M. 8600 R., MD, B. & Usa, 20894. *SNP Class Definitions*. (National Center for Biotechnology Information (US), 2005).
168. HapMap Data Rel 28 PhaseII+III, August10, on NCBI B36 assembly, dbSNP b126: chr1:11778965..11778965. Disponible en: https://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-perl/gbrowse/hapmap28_B36/#search.
169. Manolio, T. A. *et al.* Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* **461**, 747–753 (2009).
170. Iniesta, R., Guinó, E. & Moreno, V. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. *Gac. Sanit.* **19**, 333–341 (2005).
171. Takeuchi, F. *et al.* Linkage Disequilibrium Grouping of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) Reflecting Haplotype Phylogeny for Efficient Selection of Tag SNPs. *Genetics* **170**, 291–304 (2005).
172. Broad Institute of MIT and Harvard. Haploview. Disponible en: <https://www.broadinstitute.org/scientific-community/science/programs/medical-and-population-genetics/haploview/haploview>.

173. Edwards, A. W. F. G. H. Hardy (1908) and Hardy–Weinberg Equilibrium. *Genetics* **179**, 1143–1150 (2008).
174. Foulkes, A. S. *Applied Statistical Genetics with R*. (Springer New York, 2009).
175. Sergio D. Sevilla. Metodología de los estudios de asociación genética. *Insufic. Cardíaca* **2**, (2007).
176. Pilar Cacheiro Martínez. Métodos de selección de variables en estudios de asociación genética. Aplicación a un estudio de genes candidatos en Enfermedad de Parkinson. (Universidad Santiago de Compostela, 2011).
177. Erika Martínez-López, Maritza Roxana García-García, Wendy Yareni Campos-Pérez & Karina González-Becerra. Genómica nutricional: Conceptos y expectativas. *Rev. Endocrinol. Nutr.* **21**, 22–34 (2013).
178. Corella, D. *et al.* The –256T>C Polymorphism in the Apolipoprotein A-II Gene Promoter Is Associated with Body Mass Index and Food Intake in the Genetics of Lipid Lowering Drugs and Diet Network Study. *Clin. Chem.* **53**, 1144–1152 (2007).
179. Jesús Román Martínez Álvarez, Antonio Villarino Marín & Carlos de Arpe Muñoz. *Avances en Alimentación, Nutrición y Dietética*. (Fundación Alimentación Saludable, 2013).
180. Loria-Kohen, V. *et al.* Polymorphism in the CLOCK gene may influence the effect of fat intake reduction on weight loss. *Nutr. Burbank Los Angel. Cty. Calif* **32**, 453–460 (2016).
181. Grau, K. *et al.* TCF7L2 rs7903146-macronutrient interaction in obese individuals' responses to a 10-wk randomized hypoenergetic diet. *Am. J. Clin. Nutr.* **91**, 472–479 (2010).
182. Grau, K. *et al.* Macronutrient-specific effect of FTO rs9939609 in response to a 10-week randomized hypo-energetic diet among obese Europeans. *Int. J. Obes.* **2005** **33**, 1227–1234 (2009).

183. Bl, T. *et al.* Modulation of C-reactive protein and plasma omega-6 fatty acid levels by phospholipase A2 gene polymorphisms following a 6-week supplementation with fish oil. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **102–103**, 37–45 (2015).
184. Zhang, X. *et al.* Neuropeptide Y Promoter Polymorphism Modifies Effects of a Weight-Loss Diet on 2-Year Changes of Blood Pressure: the Pounds Lost Trial. *Hypertension* **60**, (2012).
185. Forster, H. P., Emanuel, E. & Grady, C. The 2000 revision of the Declaration of Helsinki: a step forward or more confusion? *Lancet Lond. Engl.* **358**, 1449–1453 (2001).
186. Cobos, A & Francesc, JJ. Como diseñar un cuaderno de recolección de datos. *Jano* **51**, 73 (1996).
187. Ortega Rosa M, Pérez-Rodrigo Carmen & López-Sobaler Ana M. Métodos de evaluación de la ingesta actual: registro o diario dietético. *Rev. Esp. Nutr. Comunitaria* **21**, 34–41 (2015).
188. Martin-Moreno, J. M. & Gorgojo, L. Valoración de la ingesta dietética a nivel poblacional mediante cuestionarios individuales: sombras y luces metodológicas. *Rev. Esp. Salud Pública* **81**, 507–518 (2007).
189. Ortega RM, López-Sobaler AM, Andrés P, Requejo AM & Molinero LM. *Programa DIAL para valoración de dietas y gestión de datos de alimentación*. (Departamento de Nutrición (UCM) Alce Ingeniería, 2004).
190. Ortega, R. M., Requejo, A. M. & Navia, B. Ingestas diarias recomendadas de energía y nutrientes para la población española. *Univ. Complut. Madr.* (2004).
191. Paul LT. in *Nutrición y Dietoterapia de Krause* 343–370 (McGraw-Hill Interamericana, 1998).
192. Verónica Dapcich *et al.* *Guía de la alimentación saludable*. (Sociedad Española de Nutrición Comunitaria, 2004).

193. Fernández-Ballart, J. D. *et al.* Relative validity of a semi-quantitative food-frequency questionnaire in an elderly Mediterranean population of Spain. *Br. J. Nutr.* **103**, 1808–1816 (2010).
194. Elosua, R., Marrugat, J., Molina, L., Pons, S. & Pujol, E. Validation of the Minnesota Leisure Time Physical Activity Questionnaire in Spanish men. The MARATHOM Investigators. *Am. J. Epidemiol.* **139**, 1197–1209 (1994).
195. Elosua, R. *et al.* Validation of the Minnesota Leisure Time Physical Activity Questionnaire In Spanish Women. Investigators of the MARATDON Group. *Med. Sci. Sports Exerc.* **32**, 1431–1437 (2000).
196. Ainsworth, B. E. *et al.* Compendium of physical activities: an update of activity codes and MET intensities. *Med. Sci. Sports Exerc.* **32**, S498-504 (2000).
197. Haskell, W. L. *et al.* Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association. *Med. Sci. Sports Exerc.* **39**, 1423–1434 (2007).
198. Redondo, A. *et al.* [Trends in leisure time physical activity practice in the 1995-2005 period in Girona]. *Rev. Esp. Cardiol.* **64**, 997–1004 (2011).
199. Durnin, J. V. & Fidanza, F. Evaluation of nutritional status. *Bibl. Nutr. Dieta* 20–30 (1985).
200. Norton KI & Olds T. *Antropométrica*. (Biosystem Servicio Educativo, 2000).
201. Consenso SEEDO'2000 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica. *Med. Clínica* **115**, 587–597 (2000).
202. Mancia, G. *et al.* 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension The Task Force for the management of arterial hypertension of the European

- Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur. Heart J.* **34**, 2159–2219 (2013).
203. Friedewald, W. T., Levy, R. I. & Fredrickson, D. S. Estimation of the Concentration of Low-Density Lipoprotein Cholesterol in Plasma, Without Use of the Preparative Ultracentrifuge. *Clin. Chem.* **18**, 499–502 (1972).
 204. Millán, J. *et al.* Lipoprotein ratios: Physiological significance and clinical usefulness in cardiovascular prevention. *Vasc. Health Risk Manag.* **5**, 757–765 (2009).
 205. de Bakker, P. I. W. *et al.* Efficiency and power in genetic association studies. *Nat. Genet.* **37**, 1217–1223 (2005).
 206. Garaulet, M. & Gómez-Abellán, P. Timing of food intake and obesity: a novel association. *Physiol. Behav.* **134**, 44–50 (2014).
 207. Garaulet, M. *et al.* PERIOD2 variants are associated with abdominal obesity, psycho-behavioral factors, and attrition in the dietary treatment of obesity. *J. Am. Diet. Assoc.* **110**, 917–921 (2010).
 208. Oguro, R. *et al.* A single nucleotide polymorphism of the adenosine deaminase, RNA-specific gene is associated with the serum triglyceride level, abdominal circumference, and serum adiponectin concentration. *Exp. Gerontol.* **47**, 183–187 (2012).
 209. Drew, B. G. *et al.* Estrogen receptor (ER) α -regulated lipocalin 2 expression in adipose tissue links obesity with breast cancer progression. *J. Biol. Chem.* **290**, 5566–5581 (2015).
 210. Smith, C. E. *et al.* Associations of the MCM6-rs3754686 proxy for milk intake in Mediterranean and American populations with cardiovascular biomarkers, disease and mortality: Mendelian randomization. *Sci. Rep.* **6**, 33188 (2016).
 211. Simoncini, T. Mechanisms of action of estrogen receptors in vascular cells: relevance for menopause and aging. *Climacteric* **12**, 6–11 (2009).

212. Ouyang P, Michos ED, Karas RH. Hormone Replacement Therapy and the Cardiovascular System: Lessons Learned and Unanswered Questions. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47(9):1741-1753. doi:10.1016/j.jacc.2005.10.076.
213. Rodríguez Esparragón, F. *et al.* Sobre los genes paraoxonasa-1 y SR-B1, y su importancia en la aterosclerosis. *Rev. Esp. Cardiol.* **59**, 154–164 (2006).
214. Cortese, C. & Motti, C. MTHFR gene polymorphism, homocysteine and cardiovascular disease. *Public Health Nutr.* **4**, 493–497 (2001).
215. Cabrera-Vera, T. M. *et al.* Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr. Rev.* **24**, 765–781 (2003).
216. Maniotis, C. *et al.* The AGT and the GNB3 polymorphisms and insulin resistance in prehypertension. *Horm. Athens Greece* **13**, 79–86 (2014).
217. Sotos-Prieto, M. *et al.* Relevant associations of the glucokinase regulatory protein/glucokinase gene variation with TAG concentrations in a high-cardiovascular risk population: modulation by the Mediterranean diet. *Br. J. Nutr.* **109**, 193–201 (2013).
218. Benozzi, S. F., Peruzza, F. & Penacchioti, G. Proteína C reactiva: un marcador bioquímico asociado con el síndrome metabólico y la obesidad abdominal. *Rev. Argent. Cardiol.* **80**, 455–460 (2012).
219. Turcot, V. *et al.* A polymorphism of the interferon-gamma-inducible protein 30 gene is associated with hyperglycemia in severely obese individuals. *Hum. Genet.* **131**, 57–66 (2012).
220. Miller, M. R. *et al.* Variant in the 3' region of the IkappaBalpha gene associated with insulin resistance in Hispanic Americans: The IRAS Family Study. *Obes. Silver Spring Md* **18**, 555–562 (2010).

221. El-Wakkad, A., Hassan, N. E.-M., Sibaii, H. & El-Zayat, S. R. Proinflammatory, anti-inflammatory cytokines and adiponkines in students with central obesity. *Cytokine* **61**, 682–687 (2013).
222. Libby, P., Ridker, P. M. & Maseri, A. Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation* **105**, 1135–1143 (2002).
223. Zulet, M. ^a A., Puchau, B., Navarro, C., Martí, A. & Martínez, J. A. Biomarcadores del estado inflamatorio: nexo de unión con la obesidad y complicaciones asociadas. *Nutr. Hosp.* **22**, 511–527 (2007).
224. Zambon, A., Brown, B. G., Deeb, S. S. & Brunzell, J. D. Genetics of apolipoprotein B and apolipoprotein AI and premature coronary artery disease. *J. Intern. Med.* **259**, 473–480 (2006).
225. Bennet, A. M. *et al.* Association of apolipoprotein E genotypes with lipid levels and coronary risk. *JAMA* **298**, 1300–1311 (2007).
226. Delgado-Lista, J. *et al.* ABCA1 gene variants regulate postprandial lipid metabolism in healthy men. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 1051–1057 (2010).
227. Pérez-Martínez, P. *et al.* Polymorphism exon 1 variant at the locus of the scavenger receptor class B type I gene: influence on plasma LDL cholesterol in healthy subjects during the consumption of diets with different fat contents. *Am. J. Clin. Nutr.* **77**, 809–813 (2003).
228. Stein, Y. & Stein, O. Lipoprotein lipase and atherosclerosis. *Atherosclerosis* **170**, 1–9 (2003).
229. Kwak, J. H. *et al.* FADS gene polymorphisms in Koreans: association with ω 6 polyunsaturated fatty acids in serum phospholipids, lipid peroxides, and coronary artery disease. *Atherosclerosis* **214**, 94–100 (2011).
230. Kröger, J. *et al.* Erythrocyte membrane phospholipid fatty acids, desaturase activity, and dietary fatty acids in relation to risk of type 2 diabetes in the European Prospective

- Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam Study. *Am. J. Clin. Nutr.* **93**, 127–142 (2011).
231. Dangour, A. D. *et al.* Nutritional quality of organic foods: a systematic review. *Am. J. Clin. Nutr.* (2009). doi:10.3945/ajcn.2009.28041
 232. Sepúlveda, V. C. N., Saavedra, C. B. P., Llancaqueo, M., Lavandero, S. & Domínguez, J. C. P. Diferencias genéticas en la disminución del colesterol por estatinas en pacientes chilenos con cardiopatía coronaria. *ResearchGate* (2007).
 233. Vernia Miralles, S. Estudio del factor de transcripción SREBP1 en estados de resistencia a insulina. (2007).
 234. Didenko, V. V. DNA Probes Using Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET): Designs and Applications. *BioTechniques* **31**, 1106–1121 (2001).
 235. Pomeroy, R. *et al.* A low-cost, high-throughput, automated single nucleotide polymorphism assay for forensic human DNA applications. *Anal. Biochem.* **395**, 61–67 (2009).
 236. Costas, J., Salas, A., Phillips, C. & Carracedo, A. Human genome-wide screen of haplotype-like blocks of reduced diversity. *Gene* **349**, 219–225 (2005).
 237. Fonollá, J. *et al.* Milk enriched with ‘healthy fatty acids’ improves cardiovascular risk markers and nutritional status in human volunteers. *Nutrition* **25**, 408–414 (2009).
 238. Celleno, L., Tolaini, M. V., D’Amore, A., Perricone, N. V. & Preuss, H. G. A Dietary supplement containing standardized *Phaseolus vulgaris* extract influences body composition of overweight men and women. *Int. J. Med. Sci.* **4**, 45–52 (2007).
 239. IPAQ. USA Spanish version translated 3/2003. SHORT LAST 7 DAYS SELF-ADMINISTERED version of the IPAQ. Revised August 2002. <http://www.ipaq.ki.se/> (2002).
 240. Raben, A., Tagliabue, A. & Astrup, A. The reproducibility of subjective appetite scores. *Br. J. Nutr.* **73**, 517–530 (1995).

241. Flint, A., Raben, A., Blundell, J. E. & Astrup, A. Reproducibility, power and validity of visual analogue scales in assessment of appetite sensations in single test meal studies. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord. J. Int. Assoc. Study Obes.* **24**, 38–48 (2000).
242. DIRECTIVA 2008/100/CE DE LA COMISIÓN de 28 de octubre de 2008 por la que se modifica la Directiva 90/496/CEE del Consejo, relativa al etiquetado sobre propiedades nutritivas de los productos alimenticios, en lo que respecta a las cantidades diarias recomendadas, los factores de conversión de la energía y las definiciones.
243. Emma Ruiz Moreno *et al.* Documentos Técnicos de Salud Pública nº D137. Encuesta de nutrición de la Comunidad de Madrid ENUCAM. (2014).
244. Jorge María Núñez Córdoba. Dieta mediterránea y riesgo de hipertensión: seguimiento a 6 años de la cohorte Seguimiento Universidad de Navarra. (Universidad de Navarra, 2008).
245. Servicio de Estadísticas Sociales del Instituto de Estadística de la Comunidad de Madrid. Indicadores Clave del Sistema de Salud. (2016).
246. Instituto de Estadística. Comunidad de Madrid. Anuario Estadístico de la Comunidad de Madrid 1985-2016. Salud y servicios sociales. (2016).
247. M Martínez Cortes, E Gil Montalbán & B Zorrilla Torras. Protocolo del estudio de prevalencia de diabetes mellitus y riesgo cardiovascular en la población adulta de la Comunidad de Madrid, PREDIMERC. (2007).
248. de Abajo Olea, S. Epidemiología, definición, clasificación, despistaje y diagnóstico de las dislipemias. *SEMERGEN - Med. Fam.* 3–9
249. Pejic, R. N. Familial Hypercholesterolemia. *Ochsner J.* **14**, 669–672 (2014).
250. Ministerio de Sanidad y Consumo. Guía de Práctica Clínica para el Manejo de Pacientes con Trastornos de Ansiedad en Atención Primaria. (2008).

251. Consejería de Sanidad, Comunidad de Madrid. Informe del Estado de Salud de la Población de la Comunidad de Madrid 2014. (2014).
252. WHO | Global status report on alcohol and health 2014. *WHO* Disponible en: http://www.who.int/substance_abuse/publications/global_alcohol_report/en/.
253. Rodríguez-Martos, A. Intervención breve en un bebedor de riesgo desde la atención primaria de salud. *Trastor. Adict.* **7**, 197–210 (2005).
254. Lucía Díez Gañán. Hábitos de salud en la población adulta de la Comunidad de Madrid 2011. Resultados del Sistema de Vigilancia de Factores de Riesgo Asociados a Enfermedades No Transmisibles en población Adulta (SIVFRENT-A). (2011).
255. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Actividad física para la salud y reducción del sedentarismo. Recomendaciones para la población. Estrategia de Promoción de la Salud y Prevención en el SNS. (2015).
256. OMS | Recomendaciones mundiales sobre la actividad física para la salud. *WHO* Disponible en: http://www.who.int/dietphysicalactivity/factsheet_recommendations/es/.
257. Martínez Nieto, C. *Ensayos clínicos en España ética, normativa, metodología y aspectos prácticos*. (Master Line & Prodigio, 2010).
258. Marrero, M. & Gerardo, E. Composición corporal: su importancia en la práctica clínica y algunas técnicas relativamente sencillas para su evaluación. *Rev. Científica Salud Uninorte* **26**, (2010).
259. C. Martínez Roldán, P. Veiga Herreros, A. Lopez Andrés, J.M. Cobo Sanz & A. Carbajal Azcona. Evaluación del estado nutricional de un grupo de estudiantes universitarios mediante parámetros dietéticos y de composición corporal. *Nutr. Hosp.* **20**, (2005).
260. Agencia Española de Seguridad alimentaria. Estrategia NAOS. Invertir la tendencia de la obesidad. (2005).

261. C, L. & Teresa, E. U. M. IMPACTO DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL COMO FACTOR DE RIESGO CARDIOVASCULAR. *Rev. Médica Clínica Las Condes* 156–163
doi:10.1016/j.rmclc.2015.04.004
262. Rennie, K. L., Coward, A. & Jebb, S. A. Estimating under-reporting of energy intake in dietary surveys using an individualised method. *Br. J. Nutr.* **97**, 1169–1176 (2007).
263. Pikholtz, C., Swinburn, B. & Metcalf, P. Under-reporting of energy intake in the 1997 National Nutrition Survey. *N. Z. Med. J.* **117**, U1079 (2004).
264. Pozo de la Calle, S. del. *Valoración nutricional de la dieta española de acuerdo al panel de consumo alimentario*. (Federación Española de la Nutrición, 2012).
265. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, and Allergies (NDA). Scientific Opinion on Dietary Reference Values for carbohydrates and dietary fibre: Dietary Reference Values for carbohydrates and dietary fibre. *EFSA J.* **8**, 1462 (2010).
266. WHO | Fats and fatty acids in human nutrition. *WHO* Disponible en:
http://www.who.int/nutrition/publications/nutrientrequirements/fatsandfattyacids_humannutrition/en/.
267. Gilaberte, Y. *et al.* La vitamina D: evidencias y controversias. *Actas Dermo-Sifiliográficas* **102**, 572–588 (2011).
268. Anta, R. M. O. & Marcos, A. M. R. *Nutriguía: manual de nutrición clínica en atención primaria*. (Editorial Complutense, 2006).
269. Schoenfeld, B. J., Aragon, A. A. & Krieger, J. W. Effects of meal frequency on weight loss and body composition: a meta-analysis. *Nutr. Rev.* **73**, 69–82 (2015).
270. Faustino Cervera Burriel, Ramón Serrano Urrea, Cruz Vico García, Marta Milla Tobarra & María José García Meseguer. Hábitos alimentarios y evaluación nutricional en una población universitaria. *Nutr. Hosp.* **28**, (2013).

271. Faerch, K., Borch-Johnsen, K., Vaag, A., Jørgensen, T. & Witte, D. R. Sex differences in glucose levels: a consequence of physiology or methodological convenience? The Inter99 study. *Diabetologia* **53**, 858–865 (2010).
272. The DECODE Study Group. Age- and Sex-Specific Prevalences of Diabetes and Impaired Glucose Regulation in 13 European Cohorts. *Diabetes Care* **26**, 61–69 (2003).
273. Horton, T. J., Grunwald, G. K., Lavelly, J. & Donahoo, W. T. Glucose kinetics differ between women and men, during and after exercise. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md 1985* **100**, 1883–1894 (2006).
274. J. R. Banegas. Epidemiología de las enfermedades cardiovasculares en España: importancia de la dislipidemia. *Nefrología* **4**, 4–8 (2013).
275. Arias, M. P. & Argemí, J. *Tratado de endocrinología pediátrica*. (Ediciones Díaz de Santos, 1997).
276. Ahmed, S. M., Clasen, M. E. & Donnelly, J. E. Management of dyslipidemia in adults. *Am. Fam. Physician* **57**, 2192–2204, 2207–2208 (1998).
277. Salanti, G., Amountza, G., Ntzani, E. E. & Ioannidis, J. P. A. Hardy-Weinberg equilibrium in genetic association studies: an empirical evaluation of reporting, deviations, and power. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* **13**, 840–848 (2005).
278. Griffiths, A. J. F. *Genética*. (McGraw-Hill Interamericana de España S.L., 2008).
279. Posthumus, M. & Collins, M. *Genetics and Sports*. (Karger Medical and Scientific Publishers, 2016).
280. Bi, M. *et al.* Association of rs780094 in GCKR with metabolic traits and incident diabetes and cardiovascular disease: the ARIC Study. *PloS One* **5**, e11690 (2010).
281. Alfred, T. *et al.* Associations between a polymorphism in the pleiotropic GCKR and Age-related phenotypes: the HALCyon programme. *PloS One* **8**, e70045 (2013).

282. Moore-Harrison, T. & Lightfoot, J. T. Driven to Be Inactive?—The Genetics of Physical Activity. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **94**, 271–290 (2010).
283. Herring, M. P., Sailors, M. H. & Bray, M. S. Genetic factors in exercise adoption, adherence and obesity. *Obes. Rev. Off. J. Int. Assoc. Study Obes.* **15**, 29–39 (2014).
284. Pollin, T. I. *et al.* Triglyceride response to an intensive lifestyle intervention is enhanced in carriers of the GCKR Pro446Leu polymorphism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **96**, E1142–1147 (2011).
285. Corrêa, M. M., Thumé, E., De Oliveira, E. R. A. & Tomasi, E. Performance of the waist-to-height ratio in identifying obesity and predicting non-communicable diseases in the elderly population: A systematic literature review. *Arch. Gerontol. Geriatr.* **65**, 174–182 (2016).
286. Grygiel-Gorniak, B., Mosor, M., Marcinkowska, J., Przyslawski, J. & Nowak, J. Impact of the PPAR gamma-2 gene polymorphisms on the metabolic state of postmenopausal women. *J. Biosci.* **41**, 427–437 (2016).
287. Chen, J. *et al.* Polymorphisms in the PPAR γ gene and their association with metabolic syndrome in Uyghurs and Kazakhs from Xinjiang, China. *Genet. Mol. Res. GMR* **14**, 6279–6288 (2015).
288. Guo, S. X. *et al.* Analysis of the haplotype and linkage disequilibrium of PPAR γ gene polymorphisms rs3856806, rs12490265, rs1797912, and rs1175543 among patients with metabolic syndrome in Kazakh of Xinjiang Province. *Genet. Mol. Res. GMR* **13**, 8686–8694 (2014).
289. Ding, Y. *et al.* Gene-gene interaction between PPAR δ and PPAR γ is associated with abdominal obesity in a Chinese population. *J. Genet. Genomics Yi Chuan Xue Bao* **39**, 625–631 (2012).

290. Wang, P. *et al.* Association between Peroxisome Proliferator-activated Receptor Gamma Gene Polymorphisms and Atherosclerotic Diseases: A Meta-analysis of Case-control Studies. *J. Atheroscler. Thromb.* **22**, 912–925 (2015).
291. Isaacs, A., Sayed-Tabatabaei, F. A., Njajou, O. T., Witteman, J. C. M. & van Duijn, C. M. The -514 C->T hepatic lipase promoter region polymorphism and plasma lipids: a meta-analysis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 3858–3863 (2004).
292. Fan, Y.-M. *et al.* Hepatic lipase promoter C-480T polymorphism is associated with serum lipids levels, but not subclinical atherosclerosis: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Clin. Genet.* **76**, 46–53 (2009).
293. Hanh, N. T. H. *et al.* Association of apolipoprotein E polymorphism with plasma lipid disorders, independent of obesity-related traits in Vietnamese children. *Lipids Health Dis.* **15**, 176 (2016).
294. Corbo, R. M. *et al.* Structural and phylogenetic approaches to assess the significance of human Apolipoprotein E variation. *Mol. Genet. Metab.* **89**, 261–269 (2006).
295. Mooijaart, S. P. *et al.* ApoE Plasma Levels and Risk of Cardiovascular Mortality in Old Age. *PLoS Med.* **3**, (2006).
296. Bercedo Sanz, A. *et al.* Association between lipid profile and Apo E genotype in Spanish children (8-15 years old). *An. Esp. Pediatr.* **49**, 120–124 (1998).
297. Grönroos, P. *et al.* Influence of apolipoprotein E polymorphism on serum lipid and lipoprotein changes: a 21-year follow-up study from childhood to adulthood. The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *Clin. Chem. Lab. Med.* **45**, 592–598 (2007).
298. Ikewaki, K., Rader, D. J., Zech, L. A. & Brewer, H. B. In vivo metabolism of apolipoproteins A-I and E in patients with abetalipoproteinemia: implications for the roles of apolipoproteins B and E in HDL metabolism. *J. Lipid Res.* **35**, 1809–1819 (1994).

299. Wilson, H. M., Patel, J. C., Russell, D. & Skinner, E. R. Alterations in the concentration of an apolipoprotein E-containing subfraction of plasma high density lipoprotein in coronary heart disease. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* **220**, 175–187 (1993).
300. Shatwan, I. M. *et al.* Impact of Lipoprotein Lipase Gene Polymorphism, S447X, on Postprandial Triacylglycerol and Glucose Response to Sequential Meal Ingestion. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, (2016).
301. Sagoo, G. S. *et al.* Seven lipoprotein lipase gene polymorphisms, lipid fractions, and coronary disease: a HuGE association review and meta-analysis. *Am. J. Epidemiol.* **168**, 1233–1246 (2008).
302. Turlo, K. *et al.* Equivalent binding of wild-type lipoprotein lipase (LPL) and S447X-LPL to GPIHBP1, the endothelial cell LPL transporter. *Biochim. Biophys. Acta* **1841**, 963–969 (2014).
303. Askari, G., Heidari-Beni, M., Mansourian, M., Esmail-Motlagh, M. & Kelishadi, R. Interaction of lipoprotein lipase polymorphisms with body mass index and birth weight to modulate lipid profiles in children and adolescents: the CASPIAN-III Study. *Sao Paulo Med. J. Rev. Paul. Med.* **134**, 121–129 (2016).
304. Baik, I., Lee, S., Kim, S. H. & Shin, C. A lipoprotein lipase gene polymorphism interacts with consumption of alcohol and unsaturated fat to modulate serum HDL-cholesterol concentrations. *J. Nutr.* **143**, 1618–1625 (2013).
305. Nettleton, J. A., Steffen, L. M., Ballantyne, C. M., Boerwinkle, E. & Folsom, A. R. Associations between HDL-cholesterol and polymorphisms in hepatic lipase and lipoprotein lipase genes are modified by dietary fat intake in African American and White adults. *Atherosclerosis* **194**, e131-140 (2007).
306. Disanto, G. *et al.* Vitamin D and multiple sclerosis hospital admissions in Scotland. *QJM Mon. J. Assoc. Physicians* **104**, 1001–1003 (2011).

307. Simpson, S. *et al.* Stimulated PBMC-produced IFN- γ and TNF- α are associated with altered relapse risk in multiple sclerosis: results from a prospective cohort study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **86**, 200–207 (2015).
308. Compher, C. *et al.* Systemic inflammatory mediators and bone homeostasis in intestinal failure. *JPEN J. Parenter. Enteral Nutr.* **31**, 142–147 (2007).
309. Garaulet, M., Ordovás, J. M. & Madrid, J. A. The chronobiology, etiology and pathophysiology of obesity. *Int. J. Obes.* 2005 **34**, 1667–1683 (2010).
310. Gómez-Abellán, P., Madrid, J. A., Ordovás, J. M. & Garaulet, M. Aspectos cronobiológicos de la obesidad y el síndrome metabólico. *Endocrinol. Nutr.* 50–61
doi:10.1016/j.endonu.2011.08.002
311. Garaulet, M. *et al.* Genetic variants in human CLOCK associate with total energy intake and cytokine sleep factors in overweight subjects (GOLDN population). *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* **18**, 364–369 (2010).
312. Gómez-Abellán, P., Hernández-Morante, J. J., Luján, J. A., Madrid, J. A. & Garaulet, M. Clock genes are implicated in the human metabolic syndrome. *Int. J. Obes.* **32**, 121–128 (2007).
313. Dashti, H. S., Scheer, F. A., Jacques, P. F., Lamon-Fava, S. & Ordovás, J. M. Short Sleep Duration and Dietary Intake: Epidemiologic Evidence, Mechanisms, and Health Implications¹². *Adv. Nutr.* **6**, 648–659 (2015).
314. Kim, T. W., Jeong, J.-H. & Hong, S.-C. The impact of sleep and circadian disturbance on hormones and metabolism. *Int. J. Endocrinol.* **2015**, 591729 (2015).
315. Asztalos, I. B. *et al.* Effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on cardiovascular disease risk factors: a randomized clinical trial. *Metabolism.* **65**, 1636–1645 (2016).

316. Balk, E. M. *et al.* *Omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Disease*. (Agency for Healthcare Research and Quality (US), 2016).
317. Lopez-Huertas, E. Health effects of oleic acid and long chain omega-3 fatty acids (EPA and DHA) enriched milks. A review of intervention studies. *Pharmacol. Res.* **61**, 200–207 (2010).
318. Bowen, K. J., Harris, W. S. & Kris-Etherton, P. M. Omega-3 Fatty Acids and Cardiovascular Disease: Are There Benefits? *Curr. Treat. Options Cardiovasc. Med.* **18**, 69 (2016).
319. Ordovas, J. M. Interacciones entre genes y entorno y factores de riesgo cardiovascular. *Rev. Esp. Cardiol.* **09**, 39–51 (2009).
320. Reinhard, W. *et al.* Association between PPAR α gene polymorphisms and myocardial infarction. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979 **115**, 301–308 (2008).
321. Xie, H.-J. *et al.* Analysis on the association between PPAR α/γ polymorphisms and lipoprotein(a) in a Chinese Han population. *Mol. Genet. Genomics MGG* **289**, 981–987 (2014).
322. Liu, M. *et al.* [Association and interaction between 10 SNP of peroxisome proliferator-activated receptor and non-HDL-C]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi* **49**, 259–264 (2015).
323. Liu, M. *et al.* [Association and interaction of peroxisome proliferator-activated receptor α with low high-density lipoprotein hyperlipidemia and with peroxisome proliferator-activated receptor γ]. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi Zhonghua Liuxingbingxue Zazhi* **33**, 1218–1223 (2012).
324. Alsaleh, A. *et al.* Interaction of PPARG Pro12Ala with dietary fat influences plasma lipids in subjects at cardiometabolic risk. *J. Lipid Res.* **52**, 2298–2303 (2011).
325. Tanaka, T. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor alpha polymorphisms and postprandial lipemia in healthy men. *J. Lipid Res.* **48**, 1402–1408 (2007).

326. Paradis, A.-M. *et al.* The peroxisome proliferator-activated receptor alpha Leu162Val polymorphism influences the metabolic response to a dietary intervention altering fatty acid proportions in healthy men. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**, 523–530 (2005).
327. Matarin, M. *et al.* Candidate gene polymorphisms for ischemic stroke. *Stroke J. Cereb. Circ.* **40**, 3436–3442 (2009).
328. Dahm, A. E. A. *et al.* Candidate gene polymorphisms and the risk for pregnancy-related venous thrombosis. *Br. J. Haematol.* **157**, 753–761 (2012).
329. Volcik, K. A. *et al.* SELP and SELPLG Genetic Variation Is Associated with Cell Surface Measures of SELP and SELPLG: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Carotid MRI Study. *Clin. Chem.* **55**, 1076–1082 (2009).
330. Reiner, A. P. *et al.* Soluble P-Selectin, SELP Polymorphisms, and Atherosclerotic Risk in European-American and African-American Young Adults The Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28**, 1549–1555 (2008).
331. Andreassi, M. G. *et al.* Individual and summed effects of high-risk genetic polymorphisms on recurrent cardiovascular events following ischemic heart disease. *Atherosclerosis* **223**, 409–415 (2012).
332. Zhou, D.-H. *et al.* SELP genetic polymorphisms may contribute to the pathogenesis of coronary heart disease and myocardial infarction: a meta-analysis. *Mol. Biol. Rep.* **41**, 3369–3380 (2014).
333. Volcik, K. A., Ballantyne, C. M., Coresh, J., Folsom, A. R. & Boerwinkle, E. Specific P-Selectin and P-Selectin Glycoprotein Ligand–1 Genotypes/Haplotypes are Associated with Risk of Incident CHD and Ischemic Stroke: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Atherosclerosis* **195**, e76–e82 (2007).

334. Cokkinos, D. V. *Introduction to translational cardiovascular research*. (Springer Cham Heidelberg New York Dordrecht London, 2014).
335. Raman, K. *et al.* Genetic markers of inflammation and their role in cardiovascular disease. *Can. J. Cardiol.* **29**, 67–74 (2013).
336. Eschen, O., Christensen, J. H., De Caterina, R. & Schmidt, E. B. Soluble adhesion molecules in healthy subjects: a dose-response study using n-3 fatty acids. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. NMCD* **14**, 180–185 (2004).
337. Lee, K. W., Blann, A. D. & Lip, G. Y. H. Effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids on plasma indices of thrombogenesis and inflammation in patients post-myocardial infarction. *Thromb. Res.* **118**, 305–312 (2006).
338. Tholstrup, T., Sandström, B., Hermansen, J. E. & Hølmer, G. Effect of modified dairy fat on postprandial and fasting plasma lipids and lipoproteins in healthy young men. *Lipids* **33**, 11–21 (1998).
339. Jacques, H. *et al.* Modified milk fat reduces plasma triacylglycerol concentrations in normolipidemic men compared with regular milk fat and nonhydrogenated margarine. *Am. J. Clin. Nutr.* **70**, 983–991 (1999).
340. German, J. B. *et al.* A reappraisal of the impact of dairy foods and milk fat on cardiovascular disease risk. *Eur. J. Nutr.* **48**, 191–203 (2009).
341. Lamarche, B. Review of the effect of dairy products on non-lipid risk factors for cardiovascular disease. *J. Am. Coll. Nutr.* **27**, 741S–6S (2008).
342. Soedamah-Muthu, S. S. *et al.* Milk and dairy consumption and incidence of cardiovascular diseases and all-cause mortality: dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *Am. J. Clin. Nutr.* **93**, 158–171 (2011).
343. van Aerde, M. A. *et al.* Dairy intake in relation to cardiovascular disease mortality and all-cause mortality: the Hoorn Study. *Eur. J. Nutr.* **52**, 609–616 (2013).

344. Staveren, W. A. van, Steijns, J. M. & Groot, L. C. P. G. M. de. Dairy Products as Essential Contributors of (Micro-) Nutrients in Reference Food Patterns: An Outline for Elderly People. *J. Am. Coll. Nutr.* **27**, 747S–754S (2008).
345. Bouchard, C. & Ordovas, J. M. in *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (ed. C. Bouchard and J.M. Ordovas) **Volume 108**, 1–15 (Academic Press, 2012).
346. Zeisel, S. H. *et al.* Highlights of the 2012 Research Workshop Using Nutrigenomics and Metabolomics in Clinical Nutrition Research. *J. Parenter. Enter. Nutr.* **37**, 190–200 (2013).
347. Ordovas, J. M. *et al.* Gene-diet interaction in determining plasma lipid response to dietary intervention. *Atherosclerosis* **118 Suppl**, S11-27 (1995).
348. Ohlsson, L. Dairy products and plasma cholesterol levels. *Food Nutr. Res.* **54**, (2010).
349. Ordovas, J. M. The genetics of serum lipid responsiveness to dietary interventions. *Proc. Nutr. Soc.* **58**, 171–187 (1999).
350. Tai, E. S. *et al.* Association between the PPARA L162V polymorphism and plasma lipid levels: the Framingham Offspring Study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **22**, 805–810 (2002).
351. Estévez-González, M. D. *et al.* HDL cholesterol levels in children with mild hypercholesterolemia: effect of consuming skim milk enriched with olive oil and modulation by the TAQ 1B polymorphism in the CETP gene. *Ann. Nutr. Metab.* **56**, 288–293 (2010).
352. Varela-Moreiras, G. *et al.* Evaluation of food consumption and dietary patterns in Spain by the Food Consumption Survey: updated information. *Eur. J. Clin. Nutr.* **64 Suppl 3**, S37-43 (2010).
353. Mosca, L. *et al.* Effectiveness-based guidelines for the prevention of cardiovascular disease in women--2011 update: a guideline from the american heart association. *Circulation* **123**, 1243–1262 (2011).

354. Udani, J. & Singh, B. B. Blocking carbohydrate absorption and weight loss: a clinical trial using a proprietary fractionated white bean extract. *Altern. Ther. Health Med.* **13**, 32–37 (2007).
355. Abumweis, S. S., Barake, R. & Jones, P. J. H. Plant sterols/stanols as cholesterol lowering agents: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Food Nutr. Res.* **52**, (2008).
356. Demonty, I. *et al.* Continuous dose-response relationship of the LDL-cholesterol-lowering effect of phytosterol intake. *J. Nutr.* **139**, 271–284 (2009).
357. Chen, J. T., Wesley, R., Shamburek, R. D., Pucino, F. & Csako, G. Meta-analysis of natural therapies for hyperlipidemia: plant sterols and stanols versus policosanols. *Pharmacotherapy* **25**, 171–183 (2005).
358. Castellanos-Jankiewicz, A., Del Bosque-Plata, L. & Tejero, M. E. Combined effect of plant sterols and dietary fiber for the treatment of hypercholesterolemia. *Plant Foods Hum. Nutr. Dordr. Neth.* **69**, 93–100 (2014).
359. Carai, M. A. *et al.* Potential efficacy of preparations derived from *Phaseolus vulgaris* in the control of appetite, energy intake, and carbohydrate metabolism. *Diabetes Metab. Syndr. Obes. Targets Ther.* **2**, 145–153 (2009).
360. Boivin, M., Zinsmeister, A. R., Go, V. L. & DiMagno, E. P. Effect of a purified amylase inhibitor on carbohydrate metabolism after a mixed meal in healthy humans. *Mayo Clin. Proc.* **62**, 249–255 (1987).
361. Manco, L., Dias, H., Muc, M. & Padez, C. The lactase -13910C>T polymorphism (rs4988235) is associated with overweight/obesity and obesity-related variables in a population sample of Portuguese young adults. *Eur. J. Clin. Nutr.* (2016).
doi:10.1038/ejcn.2016.164

362. Hartwig, F. P., Horta, B. L., Smith, G. D., de Mola, C. L. & Victora, C. G. Association of lactase persistence genotype with milk consumption, obesity and blood pressure: a Mendelian randomization study in the 1982 Pelotas (Brazil) Birth Cohort, with a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Epidemiol.* (2016). doi:10.1093/ije/dyw074
363. Corella, D. *et al.* Association of the LCT-13910C>T Polymorphism With Obesity and Its Modulation by Dairy Products in a Mediterranean Population. *Obes. Silver Spring Md* **19**, 1707–1714 (2011).
364. Araujo, M. Estudios ‘pequeños’: ¿cuál es la importancia del tamaño en los estudios clínicos? *Medwave* **11**, (2011).

7. ANEXOS

8 ANEXOS

ANEXO 1. HOJA DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL ESTUDIO SOBRE CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE LA POBLACIÓN

HOJA DE INFORMACIÓN AL VOLUNTARIO PARA ESTUDIOS GENÉTICOS RELACIONADOS CON LA ALIMENTACIÓN Y SALUD

Se solicita su participación en este Proyecto de Investigación, cuyo objetivo principal pretende profundizar en el conocimiento de los factores genéticos que pueden modular el efecto que tienen los alimentos en el organismo para mejorar la prevención de enfermedades vinculadas a la alimentación y permitir establecer tratamientos nutricionales adecuados a cada necesidad. Las diferencias genéticas que encontremos entre unas personas y otras nos pueden ayudar a explicar por qué algunas personas responden de una manera y otras de forma diferente. Esto puede ayudarnos a recomendar, en un futuro, hábitos específicos de alimentación o desarrollar alimentos especiales para reducir el colesterol, en función de los requisitos de cada persona.

De manera resumida, en este estudio se van a recoger datos de los encuestados y a continuación se procederá al estudio genético para determinar la relación de los datos recogidos (peso, grasa corporal, hábitos alimentarios, etc.) con las variantes genéticas naturales que todos poseemos. Con ello podemos identificar qué población, según sus características concretas, se beneficia más de unos alimentos concretos.

En este estudio participa personal investigador del Instituto Madrileño de Estudios Avanzados, IMDEA ALIMENTACIÓN y de la Universidad Autónoma de Madrid. Se estima que participen un total de más de

1000
candidat
os.

El participar en este estudio tiene como beneficio el mejorar el conocimiento de enfermedades relacionadas con la nutrición, tan importantes en la sociedad actual como la obesidad, diabetes tipo 2, hipercolesterolemia etc., así como la prevención y tratamiento de las mismas.

Su participación en el estudio es totalmente voluntaria, y si usted decide no participar su decisión no afectará, en absoluto, a la relación que pudiese mantener con ninguna de las instituciones implicadas en este estudio científico.

Si usted decide participar, se le tomarán sencillas medidas antropométricas (por ejemplo, peso, altura, medida de circunferencia de cintura, presión sanguínea, no descartándose alguna más de tipo similar), se le preguntará por sus hábitos alimentarios (por ejemplo, cuánta fruta consume y con qué frecuencia, cuántos lácteos y con qué frecuencia los consume, así como preguntas similares), sociales relacionados con enfermedades nutricionales (si práctica ejercicio, cuántas veces come fuera de casa y con qué frecuencia), además de una consulta sobre antecedentes familiares .

Asimismo, se le extraerá una pequeña cantidad de sangre para medir parámetros bioquímicos relacionados con la alimentación tales como colesterol total, glucosa, etc., así como para la extracción de ADN, para poder realizar el estudio científico propuesto.

La toma de muestras de sangre puede provocar a algunas personas molestias locales, mientras que otras tan sólo sienten una punzada. Después, se puede tener una sensación pulsátil.

Se le pedirá su consentimiento para realizarle las medidas físicas arriba indicadas.

Ud. debe otorgar su consentimiento informado por escrito, indicando si acepta el estudio y firmando dicho documento.

Si Ud. acepta que se guarde esa muestra para futuros estudios como se describe en el punto 3, el Investigador garantizará que guardará y utilizará la muestra hasta que ya no

quede más ADN. Una vez codificada la muestra no podrá ser destruida, pero no se podrá relacionar directamente con usted, salvo mediante un procedimiento oficial de solicitud. En todo momento, sus datos personales se preservarán conforme a la Ley Orgánica 15/1999, de Protección de Datos de Carácter Personal o futuras leyes de este ámbito, y será avalado por la custodia de la Administración.

Igualmente, se le informa de su derecho a retirarse voluntariamente del estudio, en cualquier momento, en cuyo caso sus muestras serán destruidas, a no ser informado y a ser informado sobre los resultados. En este último caso, y con el fin de preservar su identidad, lo deberá solicitar por escrito e identificarse legalmente ante la Administración custodia de sus datos.

A efectos de almacenamiento, uso, derecho a eliminación de datos este proyecto se sujeta a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal y en el Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre, por el que se aprueba el reglamento de desarrollo de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal.

CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL VOLUNTARIO PARA ESTUDIOS NUTRI-GENÉTICOS

1. Yo..... declaro bajo mi responsabilidad que **he leído** la Hoja de Información sobre el estudio y acepto participar en este estudio.

2. Se me ha **entregado una copia de la Hoja de Información al paciente** y una copia de este consentimiento informado, fechado y firmado. Se me han explicado, de forma comprensible, en un lenguaje llano, y sin tecnicismos, las características y el objetivo del estudio genético y los posibles beneficios y riesgos que puedo esperar; lo cual he comprendido. Se me ha dado tiempo y oportunidad para realizar preguntas. Todas las preguntas fueron respondidas a mi entera satisfacción.

3. Sé que **se mantendrá en secreto mi identidad** y que se identificarán mis muestras con una clave codificada.
4. Se me ha informado explícitamente de que **soy libre de retirarme del estudio genético en cualquier momento por cualquier motivo**, sin tener que dar explicación. Tras ello se procederá a la destrucción de la muestra codificada, y de cualquier información que hubiese suministrado sobre mi persona.
5. Entiendo que el objetivo del estudio genético es evaluar la población objeto del proyecto con fines de investigación.
6. Entiendo que, finalizado el estudio, si desease recibir información sobre mi perfil genético, o los resultados analíticos deberé de solicitarlo por escrito e identificarme legalmente; y que esta medida se toma con el fin de proteger la privacidad de los participantes.

Punto 1.- Yo DOY ☐ / No DOY ☐ mi consentimiento voluntariamente para que se me tomen datos sobre hábitos alimentarios, estilo de vida, médicos, así como medidas antropométricas, como altura, peso, circunferencia en cintura, presión sanguínea, y otras similares no invasivas, para la realización de este estudio.

Punto 2.- Yo DOY ☐ / No DOY ☐ mi consentimiento voluntariamente para que se me extraiga sangre con el fin de realizar las determinaciones analíticas necesarias para realizar este estudio.

Punto 3.- Yo DOY ☐ / No DOY ☐ mi consentimiento voluntariamente para que, de la muestra obtenida, se obtenga mi ADN y se pueda realizar el presente estudio nutrigenético.

Punto 4.- Yo DOY ☐ / No DOY ☐ mi consentimiento voluntariamente para que se guarde mi muestra de ADN, con desvinculación de la identidad. Esto permitirá la realización de nuevas pruebas, y estudios científicos nutrigenéticos futuros.

Punto 5.- Yo DOY ☐ / No DOY ☐ mi consentimiento para que, en un periodo, de entre cinco y diez años, se me localice para poder evaluar si los parámetros han variado a

lo largo del tiempo, así como para informarle de otros posibles estudios dónde su participación puede interesar.

Consiento en participar voluntariamente en los apartados marcados de este estudio.

Fecha:

Firma del voluntario:

Constato que he explicado las características y el objetivo del estudio genético y sus apartados, así como los riesgos y beneficios potenciales al sujeto cuyo nombre aparece escrito más arriba. El sujeto consiente en participar por medio de su firma fechada en persona.

Fecha:

Firma del Investigador o la persona que proporciona la información y el consentimiento

Nombre en letra impresa del Investigador o la persona designada de proporcionar la información

A efectos de almacenamiento, uso, derecho a eliminación de datos este proyecto se sujeta a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal y en el Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre, por el que se aprueba el reglamento de desarrollo de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal.

ANEXO 2. REGISTRO DEL CONSUMO DE ALIMENTOS Y BEBIDAS DE 72 HORAS

Instrucciones: Debe anotar **todos los alimentos, bebidas, suplementos, dietéticos y preparados** que haya consumido durante **3 días**, uno entre semana y otro, de fin de semana o festivo.

- 1) Indique el día de la semana y la fecha del día de recogida de información:

DÍA DE ENTRE SEMANA ☐ L ☒ M ☐ X ☐ J ☐ V

| FECHA: 31/01/2017

- 2) Cumplimente la información de cada una de las ingestas del siguiente modo:

Lugar y hora donde realizó la ingesta.

Lugar y hora

Indique qué técnica culinaria ha utilizado: a la plancha, hervido, asado, con salsa, guisado, frito...

Platos del menú

ALMUERZO		ALIMENTOS (Ingredientes del menú)	Cantidad (g) o tamaño de las porciones en crudo o cocinado
Lugar	<input checked="" type="checkbox"/> Casa <input type="checkbox"/> Bar/restaurante <input type="checkbox"/> Colegio		
Hora:	14:15 h		
- Primer plato:		Calabacín	100 g
	Puré de calabacín	Patata	1 unidad pequeña
		Quesito en porciones	1 unidad
		Aceite (tipo y cantidad): oliva virgen extra	1 cucharada sopera
- Segundo plato:		Carne picada de ternera	100 g
	Hamburguesas de ternera en salsa	Cebolla - Ajo	20 g - 1 diente
		Pimiento - Zanahoria	30 g - ¼ unidad mediana
		Tomate frito	3 cucharadas soperas
		Aceite (tipo y cantidad): oliva virgen extra	2 cucharadas soperas
- Postre:		Manzana	1 unidad mediana
- Pan:		Pan de barra blanco	4 dedos de ancho
- Bebida:		Agua	2 vasos

Alimentos

Especifique lo máximo posible la tipología de ingredientes utilizados para la elaboración de los platos (por ejemplo: desnatado o entero, blanco o integral; queso de Burgos, de cabra, manchego; marca comercial...

Cantidades

Indique de manera precisa la **cantidad consumida** por el niño/a de cada alimento (en gramos o en medidas caseras) y si el dato es en **crudo o cocinado**.

Cantidades orientativas

- Cucharadita de moka = 2,5 gramos
- Cucharadita de café = 5 gramos
- Cuchara de sopa = 10 gramos
- Cucharón de servir o cazo = 75 gramos
- Vaso normal = 200 mL
- Taza = 250 mL
- Tazón, bol = 300 mL
- Plato hondo lleno = 225 mL
- Plato hondo medio lleno = 150 mL



Algunos ejemplos

BEBIDAS Vasos, tazas, copas...	SOPAS, PURÉS... Tazas o platos (grandes, pequeños o medianos)	ACEITE Nº y tipo de cucharadas (soperas, de café)
LEGUMBRES Nº de cucharadas o cazos servidos, tamaño de plato...	SALSAS Y AZÚCAR Nº y tipo de cucharadas servidas y consumidas	PAN Nº de rebanadas o trozos y tamaño aproximado
EMBUTIDOS Nº de lonchas y grosor aproximado	CARNES Y PESCADOS Cantidad aproximada según lo que cocinó	FRUTAS Nº de piezas y tamaño (pequeño, mediano o grande)
PRECOCINADOS Indique marca y, de ser posible, composición	DULCES Tipo y unidades de chocolates, golosinas, bollería...	SUPLEMENTOS DIETÉTICOS Nº de comprimidos, sobres... y marca

¿Tiene dudas o quiere hacer alguna aclaración? **Anótela** a lo largo del cuestionario.

DÍA DE ENTRE SEMANA <input type="checkbox"/> L <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> X <input type="checkbox"/> J <input type="checkbox"/> V		FECHA:	
ALIMENTOS, BEBIDAS, SUPLEMENTOS Y DIETÉTICOS CONSUMIDOS POR LA MAÑANA			
DESAYUNO		ALIMENTOS (Ingredientes del menú)	Cantidad (g) o tamaño de las porciones en crudo o cocinado
<i>Lugar</i>	<input type="checkbox"/> Casa <input type="checkbox"/> Bar/restaurante <input type="checkbox"/> Otro		
<i>Hora:</i>			
(Recuerde incluir tipo de edulcorante: miel, azúcar, sacarina, panela...)			
MEDIA MAÑANA		ALIMENTOS (Ingredientes del menú)	Cantidad (g) o tamaño de las porciones en crudo o cocinado
<i>Lugar</i>	<input type="checkbox"/> Casa <input type="checkbox"/> Bar/restaurante <input type="checkbox"/> Otro		
<i>Hora:</i>			
ALMUERZO		ALIMENTOS (Ingredientes del menú)	Cantidad (g) o tamaño de las porciones en crudo o cocinado
<i>Lugar</i>	<input type="checkbox"/> Casa <input type="checkbox"/> Bar/restaurante <input type="checkbox"/> Otro		
<i>Hora:</i>			
- Primer plato:			
		Aceite (tipo y cantidad):	
- Segundo plato:			
		Aceite (tipo y cantidad):	
- Postre:			
- Pan:			
- Bebida:			

ALIMENTOS, BEBIDAS, SUPLEMENTOS Y DIETÉTICOS CONSUMIDOS POR LA TARDE			
MERIENDA		ALIMENTOS (Ingredientes del menú)	Cantidad (g) o tamaño de las porciones en crudo o cocinado
Lugar	<input type="checkbox"/> Casa <input type="checkbox"/> Bar/restaurante <input type="checkbox"/> Otro		
Hora:			
CENA		ALIMENTOS (Ingredientes del menú)	Cantidad (g) o tamaño de las porciones en crudo o cocinado
Lugar	<input type="checkbox"/> Casa <input type="checkbox"/> Bar/restaurante		
Hora:			
- Primer plato:			
		Aceite (tipo y cantidad):	
- Segundo plato:			
		Aceite (tipo y cantidad):	
- Postre:			
- Pan:			
- Bebida:			
COMIDA ENTRE HORAS NO ESPECIFICADAS ANTES		ALIMENTOS (Ingredientes del menú)	Cantidad (g) o tamaño de las porciones
Lugar	<input type="checkbox"/> Casa <input type="checkbox"/> Bar/restaurante		
Hora:			
COMIDA ENTRE HORAS NO ESPECIFICADAS ANTES		ALIMENTOS (Ingredientes del menú)	Cantidad (g) o tamaño de las porciones
Lugar	<input type="checkbox"/> Casa <input type="checkbox"/> Bar/restaurante		
Hora:			

ANEXO 3. REGISTRO DE LA FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS

INSTRUCCIONES PARA LA CORRECTA CUMPLIMENTACION DEL CUESTIONARIO DE FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS

Deberá marcar todas las respuestas con una equis y no debe haber más de una respuesta para una misma pregunta. El cuestionario está estructurado de la siguiente manera:

I- LACTEOS		AL MES	A LA SEMANA			AL DIA			
1. Leche entera (1 taza, 200 cc)	Nunca o casi nunca	1-3 al mes	1 a la semana	2-4 a la semana	5-6 a la semana	1 al día	2-3 al día	4-6 al día	+6 al día

Debe rellenar el recuadro que mejor corresponda a su frecuencia de consumo, sólo se permitirá una respuesta.

Es muy importante que se fije en las raciones de los alimentos, que están expresados en gramos (gr) o en centímetros cúbicos (cc) para poder calcular la frecuencia habitual de consumo de estos alimentos.

1. SI NUNCA CONSUME UN ALIMENTO: Rellene la primera casilla de “nunca o casi nunca”.

2. CUANDO LA RACION ESTANDAR NO COINCIDE:

Si toma más de la ración estándar deberá marcar una mayor frecuencia

Ejemplo: Si toma 100 gramos de queso de bola al día

Pregunta 12. Otros quesos: curados, semicurados (manchego, bola, emmenthal...) (ración = 50 gr).

I- LACTEOS		AL MES	A LA SEMANA			AL DIA			
12. Otros quesos: curados, semicurados (manchego, bola, emmenthal...) (ración = 50 gr).	Nunca o casi nunca	1-3 al mes	1 a la semana	2-4 a la semana	5-6 a la semana	1 al día	2-3 al día	4-6 al día	+6 al día
							X		

Si toma menos de la ración estándar deberá marcar una menor frecuencia.

Ejemplo: Si toma 150 cc de leche entera al día

Pregunta 1. Leche entera (1 taza, 200 cc)

I- LACTEOS		AL MES	A LA SEMANA			AL DIA			
2. Leche entera (1 taza, 200 cc)	Nunca o casi nunca	1-3 al mes	1 a la semana	2-4 a la semana	5-6 a la semana	1 al día	2-3 al día	4-6 al día	+6 al día
					X				

3. ALIMENTOS ESTACIONALES

Rellene la casilla que se aproxime a la frecuencia de consumo promedio anual

Ejemplo: Si se toma melón, 1 vez a la semana los 3 meses de verano

Pregunta 64. Melón (1 tajada, 200-250 gr)

IV – FRUTAS (1 pieza o ración)		AL MES	A LA SEMANA			AL DÍA			
64. Melón (1 tajada, 200-250 gr)	Nunca o casi nunca	1-3 al mes X	1 a la semana	2-4 a la semana	5-6 a la semana	1 al día	2-3 al día	4-6 al día	+6 al día

En las preguntas que hacen referencia a días y años, deben responderse tal y como se demuestra en los ejemplos siguientes:

Pregunta 72. ¿Cuántos días a la semana toma fruta como postre?

Si la respuesta correcta es 6 días a la semana, deberá marcar las respuestas de la siguiente forma:

72. ¿Cuántos días a la semana toma fruta como postre?	0 1 2 3 4 5 X 7
---	------------------------

Pregunta 137. ¿A qué edad empezaste a beber alcohol (vino, cerveza o licores), incluyendo el que tomas con las comidas con regularidad (más de 7 “bebidas” a la semana)?

Si la respuesta correcta es 19 años, rellene la respuesta tal y como le indicamos a continuación:

137. ¿A qué edad empezaste a beber alcohol (vino, cerveza o licores), incluyendo el que tomas con las comidas con regularidad (más de 7 “bebidas” a la semana)?	0 X 2 3 4 5 6 7 8 9 0 1 2 3 4 5 6 7 8 X
---	--

Pregunta 138. ¿Cuántos años has bebido alcohol con regularidad (más de 7 “bebidas” a la semana)?

Si la respuesta correcta es 10 años, rellene la respuesta tal y como le indicamos a continuación:

138. ¿Cuántos años has bebido alcohol con regularidad (más de 7 “bebidas” a la semana)?	0 X 2 3 4 5 6 7 8 9 X 1 2 3 4 5 6 7 8 9
---	--

CÓDIGO:

CUESTIONARIO DE FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS

Por favor, marcar una única opción para cada alimento

<p>Para cada alimento, marque el recuadro que indica la frecuencia de consumo por término medio durante el año pasado. Se trata de tener en cuenta también la variación verano/invierno; por ejemplo, si tomas helados 4 veces/semana sólo durante los 3 meses de verano, el uso promedio al año es 1/semana</p>	CONSUMO MEDIO DURANTE EL AÑO PASADO								
		AL MES	A LA SEMANA			AL DÍA			
	NUNCA O CASI NUNCA	1-3	1	2-4	5-6	1	2-3	4-6	6+
I – LACTEOS									
1. Leche entera (1 taza, 200 cc)									
2. Leche semidesnatada (1 taza, 200 cc)									
3. Leche descremada (1 taza, 200 cc)									
4. Leche condensada (1 cucharada)									
5. Nata o crema de leche (1/2 taza)									
6. Batidos de leche (1 vaso, 200 cc)									
7. Yogurt entero (1, 125 gr)									
8. Yogurt descremado (1, 125 gr)									
9. Petit suisse (1, 55 g)									
10. Requesón o cuajada (1/2 taza)									
11. Queso en porciones o cremoso (1, porción 25 g)									
12. Otros quesos: curados, semicurados (Manchego, Bola, Emmental...) (50 gr)									
13. Queso blanco o fresco (Burgos, cabra...) (50 gr)									
14. Natillas, flan, puding (1, 130 cc)									
15. Helados (1 cucurucho)									
II- HUEVOS, CARNES, PESCADOS (Un plato o ración de 100-150 gr, excepto cuando se indique otra cosa)									
	NUNCA O CASI NUNCA	1-3	1	2-4	5-6	1	2-3	4-6	6+
16. Huevos de gallina (uno)									
17. Pollo o pavo con piel (1 ración o pieza)									
18. Pollo o pavo sin piel (1 ración o pieza)									
19. Carne de ternera o vaca (1 ración)									
20. Carne de cerdo (1 ración)									
21. Carne de cordero (1 ración)									
22. Conejo o liebre (1 ración)									
23. Hígado (ternera, cerdo, pollo) (1 ración)									
24. Otras vísceras (sesos, riñones, mollejas) (1 ración)									
25. Jamón serrano o paletilla (1 loncha, 30 g)									
26. Jamón York, jamón cocido (1 loncha, 30 g)									
27. Carnes procesadas (salchichón, chorizo, morcilla, mortadela, salchichas, butifarra, sobrasada, 50 g)									
28. Patés, foie-gras (25 g)									
29. Hamburguesa (una, 50 g), albóndigas (3 unidades)									
30. Tocino, bacon, panceta (50 g)									
31. Pescado blanco: mero, lenguado, besugo, merluza, pescadilla,... (1 plato, pieza o ración)									
32. Pescado azul: sardinas, atún, bonito, caballa, salmón, (1 plato, pieza o ración 130 g)									
33. Pescados salados: bacalao, mejillones,... (1 ración, 60 g en seco)									
34. Ostras, almejas, mejillones y similares (6 unidades)									
35. Calamares, pulpo, chipirones, jibia (sepia) (1 ración, 200 g)									
36. Crustáceos: gambas, langostinos, cigalas, etc. (4-5 piezas, 200 g)									
37. Pescados y mariscos enlatados al natural (sardinas, anchoas, bonito, atún) (1 lata pequeña o media lata normal, 50 g)									
38. Pescados y mariscos en aceite (sardinas, anchoas, bonito, atún) (1 lata pequeña o media lata normal, 50 g)									

CONSUMO MEDIO DURANTE EL AÑO PASADO									
III - VERDURAS Y HORTALIZAS (Un plato o ración de 200 g ,excepto cuando se indique)		AL MES	A LA SEMANA			AL DÍA			
	NUNCA O CASI NUNCA	1-3	1	2-4	5-6	1	2-3	4-6	6+
39. Acelgas, espinacas									
40. Col, coliflor, brócoles									
41. Lechuga, endivias, escarola (100 g)									
42. Tomate crudo (1, 150 g)									
43. Zanahoria, calabaza (100 g)									
44. Judías verdes									
45. Berenjenas, calabacines, pepinos									
46. Pimientos (150 g)									
47. Espárragos									
48. Gazpacho andaluz (1 vaso, 200 g)									
49. Otras verduras (alcachofa, puerro, cardo, apio)									
50. Cebolla (media unidad, 50 g)									
51. Ajo (1 diente)									
52. Perejil, tomillo, laurel, orégano, etc. (una pizca)									
53. Patatas fritas comerciales (1 bolsa, 50 g)									
54. Patatas fritas caseras (1 ración, 150 g)									
55. Patatas asadas o cocidas									
56. Setas, nísalos, champiñones									

IV – FRUTAS (una pieza o ración)	NUNCA O CASI NUNCA	1-3	1	2-4	5-6	1	2-3	4-6	6+
57. Naranja (una), pomelo (uno), mandarinas (dos)									
58. Plátano (uno)									
59. Manzana o pera (una)									
60. Fresas/fresones (6 unidades, 1 plato postre)									
61. Cerezas, picotas, ciruelas (1 plato de postre)									
62. Melocotón, albaricoque, nectarina (una)									
63. Sandía (1 tajada, 200-250 g)									
64. Melón (1 tajada, 200-250 g)									
65. Kiwi (1 unidad, 100 g)									
66. Uvas (un racimo, 1 plato postre)									
67. Aceitunas (10 unidades)									
68. Frutas en almíbar o en su jugo (2 unidades)									
69. Dátiles, higos secos, uvas-pasas, ciruelas-pasas (150 g)									
70. Almendras, cacahuètes, avellanas, pistachos, piñones (30 g)									
71. Nueces (30 g)									
72. ¿Cuántos días a la semana tomas fruta como postre?			①	②	③	④	⑤	⑥	⑦

CONSUMO MEDIO DURANTE EL AÑO PASADO										
		AL MES	A LA SEMANA			AL DÍA				
V-LEGUMBRES y CEREALES Un plato o ración (150 g)		NUNCA O CASI NUNCA	1-3	1	2-4	5-6	1	2-3	4-6	6+
73. Lentejas (1 plato, 150 g cocidas)										
74. Alubias (pintas, blancas o negras) (1 plato, 150 g cocidas)										
75. Garbanzos (1 plato, 150 g cocidos)										
76. Guisantes, habas (1 plato, 150 g cocidos)										
77. Pan blanco, pan de molde (3 rodajas, 75 g)										
78. Pan negro o integral (3 rodajas, 75 g)										
79. Cereales desayuno (30 g)										
80. Cereales integrales: muesli, copos avena, all-bran (30 g)										
81. Arroz blanco (60 g en crudo)										
82. Pasta: fideos, macarrones, espaguetis, otras (60 g en crudo)										
83. Pizza (1 ración, 200 g)										
VI- ACEITES Y GRASAS Una cucharada sopera o porción individual		NUNCA O CASI NUNCA	1-3	1	2-4	5-6	1	2-3	4-6	6+
Para freír, untar, mojar en el pan, para aliñar, o para ensaladas, utilizas en total:										
84. Aceite de oliva (una cucharada sopera)										
85. Aceite de oliva extra virgen (una cucharada sopera)										
86. Aceite de oliva de orujo (una cucharada sopera)										
87. Aceite de maíz (una cucharada sopera)										
88. Aceite de girasol (una cucharada sopera)										
89. Aceite de soja (una cucharada sopera)										
90. Mezcla de los anteriores (una cucharada sopera)										
91. Margarina (porción individual, 12 g)										
92. Mantequilla (porción individual, 12 g)										
93. Manteca de cerdo (10 g)										

CONSUMO MEDIO DURANTE EL AÑO PASADO										
		MES	A LA SEMANA			AL DÍA				
VII - BOLLERIA Y PASTELERIA		NUNCA O CASI NUNCA	1-3	1	2-4	5-6	1	2-3	4-6	6+
94. Galletas tipo maría (4-6 unidades, 50 g)										
95. Galletas integrales o de fibra (4-6 unidades, 50 g)										
96. Galletas con chocolate (4 unidades, 50 g)										
97. Repostería y bizcochos hechos en casa (50 g)										
98. Croissant, ensaimada, pastas de té u otra bollería industrial comercial... (uno, 50 g)										
99. Donuts (uno)										
100. Magdalenas (1-2 unidades)										
101. Pasteles (uno, 50 g)										
102. Churros, porras y similares (1 ración, 100 g)										
103. Chocolates y bombones (30 g)										
104. Cacao en polvo- cacaos solubles (1 cucharada de postre)										
105. Turrón (1/8 barra, 40 g)										
106. Mantecados, mazapán (90 g)										

VIII – MISCELÁNEA	NUNCA O CASI NUNCA	MES	A LA SEMANA			AL DÍA			
		1-3	1	2-4	5-6	1	2-3	4-6	6+
107. Croquetas, buñuelos, empanadillas, precocinados (una)									
108. Sopas y cremas de sobre (1 plato)									
109. Mostaza (una cucharadita de postre)									
110. Mayonesa comercial (1 cucharada sopera = 20 g)									
111. Salsa de tomate frito, ketchup (1 cucharadita)									
112. Picante: tabasco, pimienta, pimentón (una pizca)									
113. Sal (una pizca)									
114. Mermeladas (1 cucharadita)									
115. Azúcar (1 cucharadita)									
116. Miel (1 cucharadita)									
117. Snacks distintos de patatas fritas: gusanitos, palomitas, maíz, etc. (1 bolsa, 50 g)									
118. Otros alimentos de frecuente consumo (especificar):									
-									

IX – BEBIDAS	NUNCA O CASI NUNCA	MES	A LA SEMANA			AL DÍA			
		1-3	1	2-4	5-6	1	2-3	4-6	6+
119. Bebidas carbonatadas con azúcar: bebidas con cola, limonadas, tónicas, etc. (1 botellín, 200 cc)									
120. Bebidas carbonatadas bajas en calorías, bebidas light (1 botellín, 200 cc)									
121. Zumos de naranja natural (1 vaso, 200 cc)									
122. Zumos naturales de otras frutas (1 vaso, 200 cc)									
123. Zumos de frutas en botella o enlatados (200 cc)									
124. Café descafeinado (1 taza, 50 cc)									
125. Café (1 taza, 50 cc)									
126. Té (1 taza, 50 cc)									
127. Mosto (100 cc)									
128. Vaso de vino rosado (100 cc)									
129. Vaso de vino moscatel (50 cc)									
130. Vaso de vino tinto joven, del año (100 cc)									
131. Vaso de vino tinto añejo (100 cc)									
132. Vaso de vino blanco (100 cc)									
133. Vaso de cava (100 cc)									
134. Cerveza (1 jarra, 330 cc)									
135. Licores, anís o anisetes... (1 copa, 50 cc)									
136. Destilados: whisky, vodka, ginebra, coñac (1 copa, 50 cc)									
¿A qué edad empezaste a beber alcohol (vino, cerveza o licores), incluyendo el que tomas con las comidas con regularidad (más de siete "bebidas" a la semana)?									
¿Cuántos años has bebido alcohol con regularidad (más de siete bebidas a la semana)?									

Si durante el año pasado tomaste vitaminas y/o minerales (incluyendo calcio) o productos dietéticos especiales (salvado, aceite de onagra, leche con ácidos grasos omega-3, flavonoides, etc.), por favor indica la marca y la frecuencia con que los toma este:

DÍA	MARCAS DE LOS SUPLEMENTOS DE VITAMINAS O MINERALES O DE LOS PRODUCTOS DIETÉTICOS	NUNCA O CASI NUNCA	MES	A LA SEMANA			AL			
			1-3	1	2-4	5-6	1	2-3	4-6	6+
138.										
139.										

ANEXO 4. CUESTIONARIO DE ACTIVIDAD FÍSICA EN EL TIEMPO LIBRE DE MINNEOSTA

ACTIVIDADES FÍSICAS	SEMANA		AÑO	
	DÍAS DE PRACTICA	MINUTOS/DÍA DE PRACTICA	DÍAS DE PRACTICA	MINUTOS/DÍA DE PRACTICA
ACTIVIDADES EN EL JARDÍN				
51. Cortar el césped con máquina	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
52. Cortar el césped manualmente	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
53. Limpiar y arreglar el jardín	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
54. Cavar el huerto	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
55. Quitar nieve con pala	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
TRABAJOS Y ACTIVIDADES CASERAS				
56. Trabajos de carpintería dentro de casa	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
57. Trabajos de carpintería (exterior)	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
58. Pintar dentro de casa	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
59. Pintar fuera de casa	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
60. Limpiar la casa	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
61. Mover muebles	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
CAZA Y PESCA				

62. Tiro con pistola	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
63. Tiro con arco	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
64. Pescar en la orilla del mar	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
65. Pescar con botas altas dentro del río	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
66. Caza menor	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
67. Caza mayor (ciervos, osos...)	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
OTROS (ESPECIFICAR)				
	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

instituto
idea
alimentación

UAM
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE MADRID

CUESTIONARIO DE ACTIVIDAD para el Proyecto "Prevención de enfermedades e identificación de alimentos más adecuados a cada individuo mediante el estudio de la interacción gen-nutriente"

1. CODIGO:

2. Fecha cuestionario: __/__/__

3. Identificación del encuestador: __. __. __

CUESTIONARIO DE ACTIVIDAD FÍSICA EN EL TIEMPO LIBRE DE MINNESOTA

A continuación encontrará un cuadro con un listado de actividades físicas y unas columnas con periodos de tiempo de realización de las mismas (semana, mes, trimestre y año). Cada columna está dividida en días y minutos.

La forma de rellenar el cuestionario es la siguiente:

- Se lee atentamente cada actividad una a una y cuando se encuentre una que se haya realizado durante la última semana, con números claros y sin salirse del recuadro se rellenan las casillas correspondientes a los días y minutos.
- Seguidamente se repite la misma acción para el último mes, el último trimestre y el último año.

Ha de tener en cuenta que si ha realizado alguna actividad la última semana supone también que la ha realizado el último mes, trimestre y año.

Para asegurar la uniformidad de la información recogida consideramos que:

- cada piso de escaleras = 1/2 min.
- una vuelta en esquí acuático = 5 min.
- un set de tenis individual = 20 min.
- un set de tenis dobles = 15 min.
- golf 9 hoyos = 90 min.

Ejemplo:

Una persona que:

- durante la última semana ha ido a caminar media hora cada día menos el fin de semana, ha de anotar un 5 en la columna de días de práctica a la semana y 30 en minutos/día de práctica. Si durante el último año también ha ido a caminar pero durante 2 meses en el verano no ha hecho esta actividad, tendrá que anotar 200 en la columna de días de práctica al año y 30 en minutos / día de práctica.

- durante la última semana ha subido 2 veces al día 2 pisos por la escalera a de anotar un 7 en la columna de días de práctica a la semana y 2 a minutos/ día de práctica. Si esta actividad la repite todo el año, tendrá que anotar 365 en la columna días de práctica al año y 2 en minutos / día de práctica.

ACTIVIDADES FÍSICAS	SEMANA		AÑO	
	DÍAS DE PRACTICA	MINUTOS/DÍA DE PRACTICA	DÍAS DE PRACTICA	MINUTOS/DÍA DE PRACTICA
ANDAR/BAILAR/SUBIR ESCALERAS				
1. Posear	5	30	200	30
5. Subir escaleras	7	2	365	2

ACTIVIDADES FÍSICAS	SEMANA		AÑO	
	DÍAS DE PRACTICA	MINUTOS/DÍA DE PRACTICA	DÍAS DE PRACTICA	MINUTOS/DÍA DE PRACTICA
ANDAR/BAILAR/SUBIR ESCALERAS				
1.Pasear	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
2.Andar de casa al trabajo y del trabajo a casa o en periodos de descanso del mismo	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
3.Andar (llevando carrito de la compra)	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
4.Andar (llevando bolsas de la compra)	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
5.Subir escaleras	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
6.Andar campo a través	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
7.Excursiones con mochila	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
8.Escalar montañas	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
9.Ir en bicicleta al trabajo	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
10.Bailar	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
11.Aeróbic o ballet	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
12.Jugar con los niños (corriendo, saltando,..)	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
EJERCICIOS DE MANTENIMIENTO GENERAL				
13.Hacer ejercicio en casa	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
14.Hacer ejercicio en un gimnasio	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
15.Caminar deprisa	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
16.Trotar ("Jogging")	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
17.Correr 8-11 km/h	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
18.Correr 12-16 km/h	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
19.Levantar pesas	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
ACTIVIDADES ACUÁTICAS				
20.Esquí acuático	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
21.Surf	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
22.Navegar a vela	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
23.Ir en canoa o remar (por distracción)	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
24.Ir en canoa o remar (en competición)	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
25.Hacer un viaje en canoa	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

ACTIVIDADES FÍSICAS	SEMANA		AÑO	
	DÍAS DE PRACTICA	MINUTOS/DÍA DE PRACTICA	DÍAS DE PRACTICA	MINUTOS/DÍA DE PRACTICA
26.Nadar (más de 150 metros en piscina)	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
27.Nadar en el mar	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
28.Bucear	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
DEPORTES DE INVIERNO				
29.Esquiar	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
30.Esqui de fondo	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
31.Patinar (ruedas o hielo)	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
OTRAS ACTIVIDADES				
32.Montar a caballo	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
33.Jugar a los bolos	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
34.Balonvolea	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
35.Tenis de mesa	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
36.Tenis individual	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
37.Tenis dobles	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
38.Badminton	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
39.Baloncesto (sin jugar partido)	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
40.Baloncesto (jugando un partido)	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
41.Baloncesto (actuando de árbitro)	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
42.Squash	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
43.Fútbol	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
44.Golf (llevando el carrito)	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
45.Golf (andando y llevando los palos)	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
46.Balonmano	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
47.Petanca	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
48.Artes marciales	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
49.Motociclismo	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
50.Ciclismo de carretera o montaña	<input type="checkbox"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>

ANEXO 5. COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DE LOS DIFERENTES TIPOS DE LECHES CONSUMIDAS

Anexo 5 - Composición nutricional de los diferentes tipos de leches consumidas			
	Leche enriquecida (500ml)	Leche semidesnatada (500ml)	Leche desnatada (500ml)
Energía (kcal)	260	232.5	175
Proteínas (g/)	17.5	15.5	16
Carbohidratos (g)	26	23.5	24
Grasa (g)	9.5	9.5	1.5
- Saturadas (g)	2.3	6.7	1.1
- Monoinsaturadas (g)	5.4	2.6	0.4
- Poliinsaturadas (g)	1.9	0.2	0.03
- Ácido Oleico (g)	5.2	2	0.3
- Ácido α -linolenico (g)	0.1	ND	ND
- EPA (g)	0.1	ND	ND
- DHA (g)	0.2	ND	ND
Vitamina A (μ g)	600	600	600
Vitamina D (μ g)	3.8	3.8	3.8
Vitamina E (mg)	7.5	ND	ND
Vitamina B6 (mg)	1,5	ND	ND
Ácido Fólico (μ g/)	150	ND	ND
EPA, ácido eicosapentaenoico ; DHA, ácido docosahexaenoico; ND, no detectado. Fuente: ²³⁷ .			

ANEXO 6. HOJA DE INFORMACIÓN Y CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL ESTUDIO DE INTERVENCIÓN NUTRICIONAL SOBRE LA EFICACIA DE LA INGESTA DIARIA DE UNA BEBIDA LÁCTEA EN VOLUNTARIOS SANOS CON SOBREPESO Y OBESIDAD

“ESTUDIO DE INTERVENCIÓN NUTRICIONAL SOBRE LA EFICACIA DE LA INGESTA DIARIA DE UNA BEBIDA LÁCTEA EN VOLUNTARIOS SANOS CON SOBREPESO Y OBESIDAD”

Promotores del estudio: CAPSA

1. ¿Qué es y qué persigue este estudio?

IMDEA Alimentación, llevará a cabo un estudio de investigación clínica, al que le invitamos a participar, para evaluar los posibles efectos del uso de bebida láctea en voluntarios sanos con sobrepeso y obesidad sobre la modificación del peso, composición corporal y marcadores de riesgo asociados a síndrome metabólico como la respuesta glucémica, perfil lipídico y tensión arterial

En las últimas dos décadas ha aumentado enormemente el interés por la relación existente entre la alimentación y la salud. El concepto clásico de “nutrición adecuada”, o aporte adecuado de nutrientes para satisfacer las necesidades básicas del organismo, está siendo sustituido por conceptos como “nutrición óptima”, “promoción de la salud” o “prevención de enfermedades”, reconociendo a la nutrición como potencial promotora de la salud. De ahí la necesidad de realizar estudios de investigación, sobre el papel de determinados alimentos que contienen nutrientes o compuestos bioactivos, con una actividad biológica capaz de modular la evolución de determinados procesos fisiopatológicos.

La obesidad es un trastorno metabólico crónico caracterizado por una excesiva acumulación de energía en forma de grasa en el organismo, que conlleva un aumento del peso corporal con respecto al valor esperado según sexo, talla y edad. El sobrepeso y la obesidad se asocian a un incremento del riesgo de desarrollo de diferentes enfermedades como dislipemias, diabetes, enfermedad cardiovascular y mortalidad en general. Es por ello que, en aquellas personas que lo padecen, se recomiendan cambios relativos a la alimentación y actividad física que puedan influir de forma positiva desde un aspecto preventivo. Además, en este grupo de pacientes el uso de alimentos funcionales podría también tener gran interés como medio para proporcionar un beneficio adicional sobre el control de la ingesta (regulación hambre/saciedad), la regulación del peso corporal, la reducción de la glucemia postprandial, entre otros, contribuyendo de este modo a la prevención de las complicaciones asociadas a esta enfermedad.

Es por ello que, el objetivo fundamental de este estudio es determinar el efecto del consumo del uso de bebida láctea en voluntarios sanos con sobrepeso y obesidad sobre la modificación del peso, composición corporal y marcadores de riesgo asociados a síndrome metabólico como la respuesta glucémica, perfil lipídico y presión arterial.

En este estudio se prevé que participen 106 voluntarios (hombres y mujeres), seleccionados desde IMDEA Alimentación y distribuidos aleatoriamente. Un grupo recibirá 200 ml de bebida láctea estudio junto o antes de la comida y durante un período de 14 semanas y el otro grupo recibirá la bebida láctea control. El consumo de las bebidas estará contemplado dentro de un plan de alimentación hipocalórico y se le darán pautas de actividad física. Antes de iniciarse el estudio será aprobado por el Comité de Ética de La Investigación de La Fundación IMDEA Alimentación (CEI IMDEA-Alimentación),

Antes de tomar la decisión de participar o no, debe de comprender el motivo de la investigación y lo que implica. Debe leer detenidamente este documento y consultar con el responsable o alguien del equipo del proyecto de investigación para aclarar cualquier duda que se le plantee.

2. Como se realiza el estudio

2.1 Tratamiento que se administra

El tratamiento consistirá en consumir diariamente 200 ml de la bebida estudio o control durante 14 semanas junto o antes de la comida. Es muy importante que tome exactamente la cantidad diaria que le solicitamos.

Deberá hacerlo como si se tratara de una medicina puesto que, como tal, es posible que no sea beneficiosa si se toma en grandes cantidades o, al revés, si se toma menos de lo recomendado, que no produzca efecto. Si no puede consumir la cantidad total prescrita lo deberá notificar al investigador. También es importante que siga las pautas de alimentación indicadas y la distribución de grupos de alimentos por comida que se le indican ya que esto puede influir sobre los efectos que la bebida pueda ofrecer. La bebida estudio posee entre sus componentes sustancias que se encuentran de forma natural en algunos alimentos como el trigo, el arroz o las alubias (y que se destruyen por el proceso de cocción previa que habitualmente hacemos de estos alimentos), estas sustancias evitan la digestión de parte del almidón de la dieta haciendo que las enzimas digestivas no puedan actuar sobre él. De este modo, se produce una menor digestión, absorción y metabolismo de los carbohidratos y por tanto de su aporte calórico, favoreciendo al mismo tiempo a una menor glucemia

postprandial y menores niveles de insulina con la consecuente menor acumulación de grasa. Además, su efecto retrasaría el vaciamiento gástrico produciendo sensación de saciedad y traducéndose en una menor ingesta de alimentos. Otros principios activos del batido en estudio como son los fructo-oligosacáridos, los esteroides vegetales y el hidroxitirosol, han mostrado un gran interés debido a sus efectos sobre el perfil de lípidos, la saciedad, la glucemia y otros trastornos asociados al sobrepeso y obesidad.

2.2 Metodología empleada

El estudio durará 14 semanas. En la primera parte del estudio tendrá una entrevista con una nutricionista (selección), quien le explicará el estudio y responderá a sus dudas acerca de él. Si se confirma que cumple los criterios para participar en el estudio, tras su asentimiento y la obtención del consentimiento informado, podrá hacerlo. En la primera visita se le asignará un código por un método de azar (informáticamente) y, ni usted ni el investigador sabrán si está recibiendo la bebida estudio o control a partir de ese momento.

Las fechas concertadas para cada visita se le indicarán antes de comenzar el estudio. Además, se le recordará que deberá rellenar y entregar los cuestionarios facilitados en la visita anterior.

Se evaluará la eficacia de la bebida estudio mediante la evolución de los parámetros de composición corporal y de los diferentes parámetros bioquímicos medidos en sangre.

Una vez que se conozcan los resultados de este estudio, se utilizarán para redactar un documento relativo a su valor que se publicará en una revista médica. Su nombre nunca aparecerá en las publicaciones.

3. ¿Cuáles son los beneficios esperables y los riesgos potenciales de este estudio?

3.1 Beneficios

Estudios realizados con inhibidores de alfa amilasa han mostrado un efecto potencial beneficioso para su uso en el control de la ingesta, el peso corporal, la acumulación de lípidos y el control de la glucemia. Estos efectos estarían mediados fundamentalmente por la inhibición enzimática que conduce a una menor digestión, absorción y metabolismo de los carbohidratos y por tanto de su aporte calórico, favoreciendo por otro lado a una menor glucemia postprandial y menores niveles de

insulina con la consecuente menor acumulación de grasa. Sin embargo, debe saber que es posible no obtener los resultados esperados.

3.2 Riesgos

Los ingredientes de la bebida en estudio son componentes normales de nuestra dieta y han sido sometidos a gran cantidad de estudios en humanos, además en ningún caso se superan las cantidades consideradas como seguras para su consumo. Algunos ingredientes de la bebida estudio podrían llegar a generar un aumento de la producción de gases causando distensión, flatulencia y malestar intestinal en personas más sensibles, esto es provocado por el bloqueo a la digestión del almidón por el que este llegaría al colon y las bacterias colónicas lo degradarían produciendo esos efectos. No obstante, con las cantidades consumidas a través de la bebida estudio no se espera que estos síntomas puedan ser más significativos que los observados al aumentar el aporte de fibra a través de la dieta.

Además, debe saber que las pruebas a las que será sometido a lo largo del estudio no supondrán ningún riesgo para su salud. Es posible, que al realizar las extracciones de sangre, pueda aparecer algún síntoma inflamatorio con enrojecimiento, dolor, en ocasiones un pequeño hematoma que suele ser transitorio.

4. Tu participación es voluntaria

Si desea participar en este estudio debe comunicárselo al investigador. Su participación es voluntaria. Debe saber que en cualquier momento puede decidir abandonar su participación, comunicándose al investigador sin tener que dar ninguna razón. En este caso, se le preguntará si su decisión está relacionada con algún acontecimiento adverso.

El investigador también podrá retirarle de este estudio si así lo creyera conveniente; también por no acudir a las visitas previstas o por no consumir la bebida estudio/control como se le haya indicado.

5. Revisión de Documentos Originales, Confidencialidad y Protección de Datos de Carácter Personal

5.1 Confidencialidad y revisión de documentos

Comprende y consiente que con el fin de garantizar la fiabilidad de los datos recogidos en este estudio, será preciso que eventualmente las autoridades sanitarias y/o miembros del Comité Ético de Investigación Clínica, tengan acceso a sus datos comprometiéndose a la más estricta confidencialidad.

De acuerdo con la ley 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal los datos personales que se le requieran (por ejemplo: edad, sexo, datos de salud) son los necesarios para cubrir los objetivos del estudio. En ninguno de los informes del estudio aparecerá su nombre y su identidad no será revelada a persona alguna salvo para cumplir con los fines del estudio, y en caso de requerimiento legal. Cualquier información de carácter personal que pueda ser identificable será conservada y procesada bajo condiciones de seguridad, con el propósito de determinar los resultados del estudio. Estos podrán ser comunicados a las autoridades sanitarias y eventualmente, a la comunidad científica a través de congresos y/o publicaciones.

Sus datos podrán ser transferidos a otros países fuera de la Unión Europea (EEUU), garantizando la protección de dicha información incluso en aquellos países cuya legislación es menos restrictiva que la española. Los datos podrán ser también utilizados con otros fines de carácter científico. Si sus datos son usados para otros objetivos, primero se disociarán; es decir, toda la información que permita identificarle se eliminará y sólo se procesará de forma que no se pueda conocer su identidad. De acuerdo con la ley vigente tiene derecho al acceso de sus datos personales; así mismo, y si está justificado, tiene derecho a su rectificación y cancelación. Si así lo desea, deberá solicitarlo al investigador a cargo de este estudio.

6. Información que debes saber

6.1 Seguro

De acuerdo con la Legislación Española vigente, este estudio no requiere de la contratación de seguro para su realización. No obstante, se ha contratado una póliza de seguro de Responsabilidad Civil con un periodo de reclamación de 36 meses después de finalizado el ensayo con la empresa HDI Seguros.

6.2 Modo de compensación económica

Los voluntarios que participen en el estudio de 14 semanas recibirán un pago de 50€ en compensación por los viajes, desplazamientos, gastos extraordinarios y pérdidas de productividad que le haya podido ocasionar el hecho de acudir a las diferentes visitas. Para aquellos que participen además en el estudio completo están previstos otros 100 euros en compensación de las molestias y tiempos adicionales. Dicho pago será realizado al finalizar la participación de cada voluntario en el estudio y siempre y cuando haya cumplido con todos los requisitos establecidos por el mismo.

6.3 Información adicional

Usted deberá saber que una vez finalizado el estudio en caso de que se conservase muestra de sangre se procederá a su destrucción una vez finalizado el mismo.

Ante cualquier eventualidad que pudiera surgir mientras está participando en este estudio o para cualquier pregunta sobre el mismo que quiera hacer tras leer este documento, por favor diríjase a:

<i>Nombre del estudio</i>	ESTUDIO DE INTERVENCIÓN NUTRICIONAL SOBRE LA EFICACIA DE LA INGESTA DIARIA DE UNA BEBIDA LÁCTEA EN VOLUNTARIOS SANOS CON SOBREPESO Y OBESIDAD
<i>Nombre del IP</i>	<i>Dra. Viviana Loria-Kohen</i>
<i>Dirección</i>	<i>IMDEA Alimentación</i>

Se entregará copia de esta información del consentimiento firmado y fechado.

CONSENTIMIENTO INFORMADO DEL VOLUNTARIO PARA ESTUDIOS CLÍNICO

1. Yo..... declaro bajo mi responsabilidad que **he leído** la Hoja de Información sobre el estudio y acepto participar en este estudio.
2. Se me ha **entregado una copia de la Hoja de Información al paciente** y una copia de este consentimiento informado, fechado y firmado. Se me han explicado, de forma comprensible, en un lenguaje llano, y sin tecnicismos, las características y el objetivo del estudio clínico y los posibles beneficios y riesgos que puedo esperar; lo cual he comprendido. Se me ha dado tiempo y oportunidad para realizar preguntas. Todas las preguntas fueron respondidas a mi entera satisfacción.
3. Sé que se **mantendrá en secreto mi identidad** y que se identificarán mis muestras con una clave codificada.
4. Se me ha informado explícitamente de que **soy libre de retirarme del estudio clínico en cualquier momento por cualquier motivo**, sin tener que dar explicación.
5. Entiendo que el objetivo del estudio clínico es evaluar la población objeto del proyecto con fines de investigación.
6. Entiendo que, finalizado el estudio, si desearé recibir información sobre mis resultados analíticos deberé de solicitarlo por escrito e identificarme legalmente; y que esta medida se toma con el fin de proteger la privacidad de los participantes.

Punto 1.- Yo DOY ☐ / No DOY ☐ mi consentimiento voluntariamente para que se me tomen datos sobre hábitos alimentarios, estilo de vida, médicos así como medidas antropométricas, como altura, peso, circunferencia en cintura, presión sanguínea, y otras similares no invasivas, para la realización de este estudio.

Punto 2.- Yo DOY ☐ / No DOY ☐ mi consentimiento voluntariamente para que se me extraiga sangre con el fin de realizar las determinaciones analíticas necesarias para realizar este estudio.

Punto 3.- Yo DOY ☐ / No DOY ☐ mi consentimiento para que, en un periodo, de entre cinco y diez años, se me localice para poder evaluar si los parámetros han variado a lo largo del tiempo.

Consiento en participar voluntariamente en los apartados marcados de este estudio.

Fecha:

Firma del voluntario:

Constato que he explicado las características y el objetivo del estudio genético y sus apartados, así como los riesgos y beneficios potenciales al sujeto cuyo nombre aparece escrito más arriba. El sujeto consiente en participar por medio de su firma fechada en persona.

Fecha:

Firma del Investigador o la persona que proporciona la información y el consentimiento

Nombre en letra impresa del Investigador o la persona designada de proporcionar la información

A efectos de almacenamiento, uso, derecho a eliminación de datos este proyecto se sujeta a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal y en el Real Decreto 1720/2007, de 21 de diciembre, por el que se aprueba el reglamento de desarrollo de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal.

ANEXO 7. EJEMPLO DE PLAN DE ALIMENTACIÓN HIPOCALÓRICO INDIVIDUALIZADO

NÚMERO DE RACIONES RECOMENDADAS POR GRUPO DE ALIMENTOS (1500)

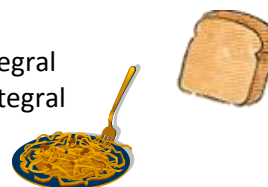
Grupo de Alimentos	NÚMERO DE RACIONES AL DÍA
PAN, CEREALES, PASTA, PATATA Y LEGUMBRE 	4
VERDURAS 	2
FRUTAS 	3
LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS   	1 + 1
CARNES, PESCADOS Y HUEVOS. 	2
GRASAS Y ACEITES. 	2

CANTIDADES EQUIVALENTES A UNA RACION POR GRUPO DE ALIMENTO

PAN, CEREALES, PASTA, PATATA Y LEGUMBRES

1 RACIÓN equivale a:

- 40-60 g de pan de barra (1/4 de barra), preferentemente integral
- 40-60 g de pan de molde (2 rebanadas), preferentemente integral
- 40-60 g de pan de pita (1 unidad)
- 40-60 g de pan de centeno (1 rebanada)
- 4 a 5 tortitas de arroz o maíz
- 30 g de harina blanca o integral
- 40 g de biscotes o 3-4 unidades
- 40 g de galletas tipo "María" o biscochos 5-6 unidades
- 30 g de cereales de desayuno sin azúcar normales o integrales: 4 cucharadas soperas
- 50 g de pasta (un caso pequeño en crudo) o 150 g (1 plato raso en cocido)
- 50 g de arroz blanco o integral (un caso pequeño en crudo) o 150 g (1 plato raso en cocido)
- 50 g de legumbres: lentejas, garbanzos, judías, etc. (un caso pequeño en crudo) o 150 g (1 plato raso en cocido)



- 150 g de maíz dulce en lata (un plato raso o media lata pequeña)
- 200 g o 2 patatas pequeñas

VERDURAS



1 RACIÓN equivale a:

- 1 plato de ensalada variada
- 1 plato de verdura cocida
- 200 g o 1 tomate grande
- 200 cc de zumo de tomate o sopas variadas caseras

FRUTAS



1 RACIÓN equivale a:

- 1 pieza mediana: manzana, pera, naranja, kaki
- 2 piezas pequeñas de: mandarina, kiwi
- 5 fresones
- 2 rodajas de piña al natural
- 1 raja de sandía

LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS



1 RACIÓN equivale a:

- 200 cc de leche desnatada
- 2 yogures desnatados
- 1 cuajada
- 100 g de queso blanco desnatado (Quarq): 6 cucharadas soperas
- 40 g de queso Philadelphia (2 cuch soperas)
- 20 g de queso parmesano de rallar: 2 cucharadas soperas
- 1 tarrina de queso de Burgos pequeña, preferentemente desnatada
- 20 g o 1 loncha de queso sándwich

CARNES, PESCADOS Y HUEVOS.



1 RACIÓN equivale a:

- 100 g de carne de vaca, pollo: 1 filete pequeño o ¼ de pollo o conejo
- 120-200 g de pescado blanco o 1 filete mediano o 2 latas de atún al natural o 100 g de salmón
- huevo: 1 unidad entera + 1 clara
- 50 g o 2 lonchas de jamón York o pavo o jamón serrano sin la grasa

GRASAS Y ACEITES



1 RACIÓN equivale a:

- 10 cc de aceite: 1 cucharada sopera
- 15 almendras, avellanas o cacahuetes
- 7 mitades de nuez
- 20 aceitunas

LOS SIGUIENTES ALIMENTOS Y BEBIDAS PUEDEN CONSUMIRSE LIBREMENTE:

- Especias: ajo, laurel, orégano, tomillo, etc.
- Vinagres: de vino, balsámico, módena, etc.
- Salsa de soja
- Encurtidos: pepinillos, cebolletas, etc.
- Bebidas: infusiones sin azúcar, refrescos sin azúcar, gaseosa.
- Caramelos y chicles sin azúcar.
- Ketchup y mostaza hasta 30 g/día.

EJEMPLOS DE DISTRIBUCIÓN DE LAS RACIONES/DÍA

- Ejemplo 1

	De	Co	Me	Ce	Total
LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS	1	BATIDO			2
PAN, CEREALES, PASTA, PATATA Y LEGUMBRE	1	2		1	4
VERDURAS		½		1 y ½	2
FRUTAS		1	1	1	3
CARNES, PESCADOS Y HUEVOS		1		1	2
GRASAS Y ACEITES		1		1	2

- Ejemplo 2

	De	Co	Me	Ce	Total
LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS	1			BATIDO	2
PAN, CEREALES, PASTA, PATATA Y LEGUMBRE		1	1	2	4
VERDURAS		1 y ½		½	2
FRUTAS	1	1		1	3
CARNES, PESCADOS Y HUEVOS		1		1	2
GRASAS Y ACEITES		1		1	2

	MENÚ BASE	LUNES	MARTES	MIÉRCOLES	JUEVES	VIERNES	SABADO	DOMINGO
Desayuno	LECHE Y PRODUCTOS LÁCTEOS (1 ración)	Leche desnatada	Yogures	Leche desnatada	Queso Burgos	Leche desnatada	Cuajada	Queso en lonchas
Hora:	PAN, CEREALES, PASTA, PATATA Y LEGUMBRE (1 ración)	Pan integral	Cereales integrales	Galletas María	Pan blanco	Biscotes	Cereales integrales	Pan integral
Comida	VERDURA (1/2 ración)	PASTA CON VERDURA	LEGUMBRE CON VERDURA	VERDURA CON PATATA	VERDURAS CON PATATA	LEGUMBRE	ENSALADA	ARROZ CON VERDURAS, PESCADO, MARISCO
Hora:	CEREALES, PASTA, PATATA Y LEGUMBRE (1 ración)							
	CARNES, PESCADOS Y HUEVOS (1 ración)	TERNERA	POLLO	PESCADO	LOMO CERDO	TERNERA CON VERDURA	PESCADO AZUL	
	FRUTAS (1 ración)	Fruta	Fruta	Fruta	Fruta	Fruta	Fruta	Fruta
	PAN (1 ración)	Pan	Pan	Pan	Pan	Pan	Pan	Pan
	GRASAS Y ACEITES (1 ración)	Aceite Oliva	Aceite Oliva	Aceite Oliva	Aceite Oliva	Aceite Oliva	Aceite Oliva	Aceite Oliva
	BATIDO ESTUDIO (1 Brick)	Batido	Batido	Batido	Batido	Batido	Batido	Batido
Merienda	FRUTAS (1 ración)	Fruta	Fruta	Fruta	Fruta	Fruta	Fruta	Fruta
Hora:								
Cena	VERDURA (1 ración y 1/2)	ENSALADA	SOPA VERDURAS	ENSALADA	PURÉ DE VERDURAS	VERDURAS	SOPA DE VERDURAS	ENSALADA
Hora:	CARNES, PESCADOS Y HUEVOS (1 ración)	HUEVO	PESCADO BLANCO	BOCADILLO	PESCADO CON ENSALADA	HUEVOS	BOCADILLO	CARNE
	FRUTAS (1 ración)	Fruta	VERDURAS	Fruta	Fruta	Fruta	Fruta	Fruta
	PAN (1 ración)	Pan	Pan	Pan	Pan	Pan	Pan	Pan
	GRASAS Y ACEITES (1 rac)	Aceite Oliva	Aceite Oliva	Aceite Oliva	Aceite Oliva	Aceite Oliva	Aceite Oliva	Aceite Oliva

ANEXO 8. COMPOSICIÓN NUTRICIONAL DE LAS BEBIDAS ESTUDIO

Anexo 8 - Composición nutricional de las bebidas estudio.				
Bebida láctea estudio (BLE)		Bebida láctea control (BLC)		
Contenido	200 ml	200 ml		
Conservación	Preservar de la luz. Mantener en lugar fresco y seco. Agitar antes de abrir.		Preservar de la luz. Mantener en lugar fresco y seco. Agitar antes de abrir.	
Lista de ingredientes	Agua, maltodextrina, proteínas lácteas, aceite de girasol alto en oleico, fibra, cacao (1.50 %), esteroides vegetales (0.70 %), fructo-oligosacáridos (0.45 %), extracto de judía blanca, sales minerales (citrato cálcico, citrato potásico, fosfato disódico, lactato de magnesio, pirofosfato de hierro, gluconato de zinc, sulfato de manganeso, gluconato de cobre, picolinato de cromo, yoduro potásico, selenito sódico, molibdato sódico), vitaminas (A, B1, B2, B3, B5, B6, B8, B9, B12, C, D, E y K), hidroxitirosol, sucralosa, estabilizantes (E-460, E-466, E-407) y aromas		Agua, maltodextrina, proteínas lácteas, aceite de girasol alto en oleico, cacao (1.50%), sales minerales (fosfato disódico), sucralosa, estabilizantes (E-460, E-466, E-407) y aromas	
Información nutricional	Valores medios por 100 ml		Valores medios por 100 ml	
	Valor energético (kcal/kJ)	88/367	Valor energético (kcal/kJ)	84/352
	<i>Proteínas (g)</i>	4	<i>Proteínas (g)</i>	4
	<i>Hidratos de carbono (g)</i>	9	<i>Hidratos de carbono (g)</i>	9
	de los cuales azúcares (g)	1	de los cuales azúcares (g)	0,9
	lactosa (g)	0,02	lactosa (g)	0,02
	<i>Grasas (g)</i>	3,5	<i>Grasas (g)</i>	3,5
	de las cuales saturadas (g)	0,4	de las cuales saturadas (g)	0,4
	Fibra (g)	2	Fibra (g)	0,2
	Sal (g)	0,25		0,25
	Principios activos			
	Fructo-oligosacáridos (FOS) (g)	0,45	-----	
	Faseolamina (mg)	55	-----	
	Esteroides vegetales (g)	0,75	-----	
	Hidroxitirosol (mg)	7,5	-----	
	Vitaminas		% CDR	
	A (µg)	120	15	
	B1 (mg)	0.17	15	
	B2 (mg)	0.21	15	
	B3 (mg)	2.4	15	
	B5 (mg)	0.9	15	
	B6 (mg)	0.21	15	
	B8 (µg)	5	10	
	B9 (µg)	30	15	
	B12 (µg)	0.38	15	
	C (mg)	8	10	
	D (µg)	0.75	15	
	E (mg)	1,8	15	
	K (µg)	11.3	15	
	Minerales		% CDR	
	Sodio (mg)	100		100
	Calcio (mg)	120	15	25

Fósforo (mg)	35	35
Hierro (mg)	1,4	10
Potasio (mg)	100	
Magnesio (mg)	18.75	
Cobre (mg)	0,15	15
Zinc (mg)	1	10
Manganeso (mg)	0,3	15
Yodo (µg)	22,5	15
Molibdeno (µg)	7,5	15
Cromo (µg)	10	25
Cloruro (µg)	80	10
Selenio (µg)	8,25	15

ANEXO 9. ESQUEMA ACTIVIDADES DEL ESTUDIO DE INTERVENCIÓN NUTRICIONAL SOBRE LA EFICACIA DE LA INGESTA DIARIA DE UNA BEBIDA LACTEA EN VOLUNTARIOS SANOS CON SOBREPESO Y OBESIDAD

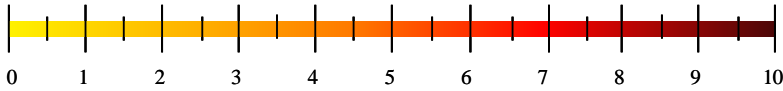
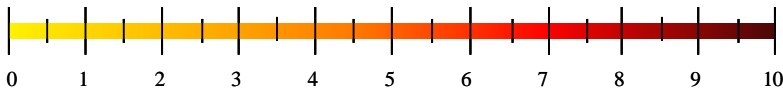
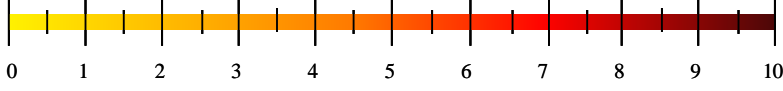
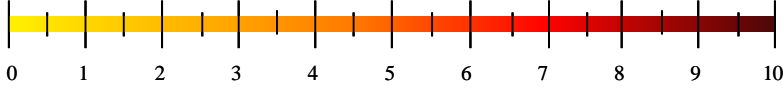
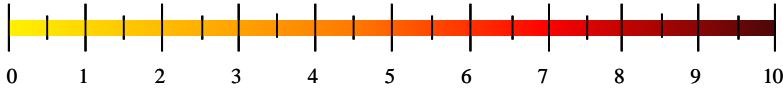
Anexo 9 - Esquema del estudio de las actividades realizadas en las diferentes visitas					
	Fase de Selección	Fase de Intervención			
	V 0 S -1	V 1 S 0	V 2 S 4	V 3 S 8	V 4 S 12
Selección y entrada del estudio					
Criterio de inclusión/exclusión					
Consentimiento Informado					
Entrega del material a completar					
Aleatorización					
Historia Clínica					
Presión Arterial y Frecuencia cardíaca					
Estudio Antropométrico clásico y BIA					
Analítica de sangre					
Recogida cuestionario de control de Actividad Física					
Recogida Estudio dietético (Registro 72 horas)					
Cuestionario sobre tolerancia del producto.					
Cuestionario sobre consumo del producto.					
Entrega del cuestionario de Percepción sensorial del producto.					
Indicación de pauta a seguir sobre la ingesta del producto.					
Indicación de dieta y ejercicio y seguimiento de la misma.					
Revisar el material completado por el voluntario.					
V, visita. S, semana.					

ANEXO 10. ESCALA ANALOGICA VISUAL

Responda sucesivamente cada una de las 5 preguntas que se presentan a continuación. Las diferentes sensaciones evaluadas (hambre, saciedad, plenitud, deseo de ingerir algún alimento, deseo de alimento graso...) se presentan en una escala de 0 a 100. Tenga en cuenta lo que representa cada pregunta. Deberá responder estas preguntas en cada uno de los tiempos indicados (T-1; T0; T1; T2; T3; T4).

Tiempo -1 estando en ayunas	Tiempo 2 (60 min después del desayuno)
Tiempo 0 (inmediatamente después del desayuno)	Tiempo 3 (90 min después del desayuno)
Tiempo 1 (30 min después del desayuno)	Tiempo 4 (120 min después del desayuno)

Tiempo -1 estando en ayunas

ESCALA ANALÓGICA VISUAL PARA VALORAR APETITO Y SACIEDAD	
Rellenar esta escala <u>justo antes</u> del desayuno (ayunas).	
<p>1. Marque con una línea vertical su grado de hambre en la escala siguiente</p> 	
<p>2. Marque con una línea vertical su grado de saciedad en la escala siguiente</p> 	
<p>3. Marque con una línea vertical su grado de plenitud en la escala siguiente</p> 	
<p>4. Marque con una línea vertical su grado de deseo de ingerir algún alimento</p> 	
<p>5. Marque su grado de deseo de ingerir algo graso, salado, dulce o sabroso</p> 	

9. ARTÍCULOS Y COMUNICACIONES **CIENTÍFICAS**

9 ARTÍCULOS Y COMUNICACIONES CIENTÍFICAS

9.1 Artículos científicos

Loria-Kohen V, **Espinosa-Salinas I**, Marcos-Pasero H, Lourenço-Nogueira T, Herránz J, Molina S, *et al.* **Polymorphism in the CLOCK gene may influence the effect of fat intake reduction on weight loss.** Nutrition. 2016;32(4):453-60.

Vargas T, Moreno-Rubio J, Herránz J, Cejas P, Molina S, González-Vallinas M, Mendiola M, Burgos E, Aguayo C, Custodio AB, Machado I, Ramos D, Gironella M, **Espinosa-Salinas I**, Ramos R, Martín-Hernández R, Risueño A, De Las Rivas J, Reglero G, Yaya R, Fernández-Martos C, Aparicio J, Maurel J, Feliu J, Ramírez de Molina A. **ColoLipidGene: signature of lipid metabolism-related genes to predict prognosis in stage-II colon cancer patients.** Oncotarget. 2015;6(9):7348-63.

Loria-Kohen V, **Espinosa-Salinas I**, Ramírez de Molina A, Casas-Agustench P, Herránz J, Molina S, *et al.* **A genetic variant of PPARA modulates cardiovascular risk biomarkers after milk consumption.** Nutrition. 2014;30(10):1144-50.

Espinosa-Salinas I, Rodriguez-Casado A, Molina S, Rodriguez-Gonzalez A, M. Ordovás J, Ramírez de Molina A. **Beneficial Effects of Bioactive Phospholipids: Genomic Bases.** Current Nutrition & Food Science. 2011;7(3):145-54.

En prensa: Loria Kohen V, Marcos-Pasero H, de la Iglesia R, Aguilar-Aguilar E, **Espinosa-Salinas I**, Herranz J, Ramírez de Molina A, Reglero G. **Sensibilidad Química Múltiple: caracterización fenotípica estado nutricional y calidad de vida de 52 pacientes.** Medicina Clínica. DOI: 10.1016/j.medcli.2017.01.022

9.2 Comunicaciones científicas

Isabel Espinosa Salinas, Viviana Loria Kohen, Helena Marcos Pasero, Susana Molina, Jesús Herránz, Ana Ramírez de Molina, *et al.* **Influencia de la variante genética APOE Arg176Cys sobre los niveles de apolipoproteína B-100, LDL colesterol y marcadores de riesgo cardiovascular.** Nutrición Clínica en Medicina. 2015;9(1):52.

Isabel Espinosa Salinas; Viviana Loria Kohen; Jesús Herránz; Susana Molina; Juristo Fonollá; Mónica Olivares; Guillermo Reglero Rada; Ana Ramírez de Molina; José María Ordovás. **PPARA genetic variant modifies the response after consumption of skimmed or semi-skimmed milk**

on cardiovascular risk biomarkers. 20th international Congress of Nutrition: Granada, Spain, September 15–20, 2013. *Ann nutr metab.* 2013;63(suppl. 1):1-1960.

Casas-Agustench P, Molina S, **Espinosa-Salinas I**, Olivares M, Reglero G, Ordovás JM, *et al.* **SELP Variant Modulates Plasma HDL-C Responses in Subjects with Moderate Cardiovascular Risk after Skimmed Milk Consumption.** *FASEB J.* 2013;27(1 Supplement):640.21-640.21.

Loria-Kohen V, **Espinosa-Salinas I**, Molina S, Herranz J, Reglero G, Ordovás JM, de Molina AR. **Genetic variants in lipid metabolism and association with cardiovascular risk in the Cantoblanco Platform of Food and Nutritional Genomics (GENYAL).** *Annals of Nutrition and Metabolism* 63, 288, Supplement 1 (2013).

Espinosa-Salinas I, Ramírez de Molina A, Vargas T, Moreno-Rubio J, Cejas P, Gonzalez-Vallinas M, *et al.* **Nutritional Genomics: identification of a genetic-signature for the analysis of metabolic alterations on nutritional-related diseases.** *Annals of Nutrition and Metabolism.* 2011;58:178-9.

Ramírez de Molina A, Reglero G, Marín F, **Espinosa-Salinas I**, Molina S. **The GENYAL Project: Establishment of a Nutritional Genomic Platform for the study of gene-diet interactions.** *Annals of Nutrition and Metabolism* 58, 178 (2011)

Gonzalez-Castejon M, Marin F, Soler C, **Espinosa Salinas I**, Ramirez de Molina A, Reglero G, *et al.* **Nutritional Genomics: SNPs Selection for Disease-Causing Genes Considering Protein Biophysical Properties.** *Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics.* 2010;3(2-3):71-71.

Espinosa Salinas I, Gonzalez-Vallines M, Rodriguez-Casado A, Ramos R, Molina S, Ramirez de Molina A. **Identification of a Metabolic Gene Expression Profile for the Analysis of Lipid Metabolism Alterations on Nutritional-Related Diseases.** *Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics.* 2010;3(2-3):72-72.

